



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

Trabajo de Tesis Doctoral

**Reacciones de fotodegradación de tirosina,
histidina, metionina y hormona
estimulante de los melanocitos inducidas
por pterina**

Ing. Diana Carolina Castaño Espinal
Director: Dr. Andrés H. Thomas
2016

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección del Dr. Andres H. Thomas. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, 2016

A mi novio Mauricio

Agradecimientos

Agradezco a:

La Facultad de Ciencias Exactas de Universidad Nacional de La Plata por la educación pública y gratuita, donde fue posible mi formación de postgrado.

La Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis. Al CONICET, por el otorgamiento de la beca que me permitió dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis.

El Dr. Andrés Thomas, director de este trabajo de tesis, por su ayuda y dedicación durante estos años, por la paciencia, por estar siempre disponible para resolver los problemas y discutir resultados. Y principalmente, por enseñarme el valor del trabajo en grupo.

La Dra. Patricia Vicendo del Laboratoire des IMRCP de la Université Paul Sabatier, por toda su ayuda durante mi estadía en Toulouse.

La Dra. Esther Oliveros por su ayuda en la interpretación de algunos resultados y en la discusión de los mecanismos. A Esther y André, por toda la ayuda brindada durante mi estadía en Toulouse.

La Dra. Nathalie Martins-Froment, por su colaboración en los experimentos de Espectrometría de masas.

A las chicas de la casita, a las que estaban cuando llegué y a las que vinieron después, Laura, Caro, Mary S., Mariana V., Adri, Lara, Sandra, Maira y Noel. Gracias por el acompañamiento, por la ayuda, siempre desinteresada, cuando las necesitaba. Por los momentos compartidos que me hicieron disfrutar más estos años de trabajo. Por haberme acompañado estos años en La Plata, por ser mis amigas.

Todos los compañeros de trabajo del INIFTA, especialmente a la gente del primer piso y de la casita, por los lindos momentos compartidos.

Mi familia que siempre me apoyó y acompañó todos estos años que estuve lejos de mi país, en especial a mis padres. Por estar siempre conmigo y entender que esto era importante para mí formación, por las despedidas y las bienvenidas, por todos los detalles que hicieron que no extrañe tanto mi país.

Mauricio... por apostar a una relación a distancia y apoyarme cada día en este viaje que emprendí. Por estar día tras día pendiente de mí y de mis necesidades y además entenderme. Por estar siempre dispuesto para mí. Gracias amor.

Prólogo

La radiación UV es la porción más energética que alcanza la superficie terrestre, este tipo de radiación, y en mucho menos proporción la luz visible, son capaces de modificar la estructura química de ciertas macromoléculas presentes en diferentes tejidos. La exposición de organismos a la radiación magnética desencadena procesos físicos y químicos, que pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para la vida. Dichos procesos son variados e incluyen la simple captación de radiación, la fotosíntesis, procesos fototóxicos en los cuales ocurren modificaciones químicas que ocasionan daño al organismo. En particular, los cambios químicos sufridos por las proteínas y el ADN producen graves consecuencias a nivel celular.

Las moléculas pueden sufrir modificaciones a través de la radiación principalmente por dos mecanismos, el primero es una absorción directa de luz por parte de la molécula. Este tipo de procesos ocurren normalmente con una probabilidad baja ya que el tipo de radiación que absorben la mayoría de las macromoléculas es filtrada por la atmósfera. El otro mecanismo es un proceso indirecto, en donde un segundo compuesto denominado fotosensibilizador absorbe radiación, lo que conlleva a la generación de estados excitados, los cuales desencadenan reacciones que involucran a diferentes biomoléculas. Estas últimas pueden, a su vez, ocurrir a partir de la transferencia de electrones entre sensibilizador y sustrato (Tipo I) o mediante la oxidación del sustrato por 1O_2 generado fotoquímicamente por el fotosensibilizador (Tipo II). La radiación UV-A y Vis no es filtrada por la atmósfera y por lo tanto puede ser absorbida por diferentes fotosensibilizadores.

Muchos heterociclos naturales, tales como pterinas son fotoquímicamente activos y participan en diversos procesos fotosensibilizados de gran interés biológico y médico. Dichos procesos incluyen, entre otros, la captación de la radiación en fotosensores biológicos, la fototoxicidad a través del daño fotosensibilizado del ADN y otras biomoléculas, reacciones de descomposición para dar compuestos tóxicos y aplicaciones médicas como la terapia fotodinámica.

Las pterinas son compuestos heterocíclicos naturales que se encuentran comúnmente en la naturaleza, las cuales tienen estructuras químicas, propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas muy variadas. Este tipo de compuestos, pueden actuar como fotosensibilizadores a través de diferentes mecanismos (Tipo I y Tipo II). Se ha demostrado que la pterina (Ptr), el compuesto no sustituido de esta familia, es capaz de modificar ADN, nucleótidos, proteínas, péptidos y aminoácidos a través de procesos

fotosensibilizados. Las pterinas oxidadas no están presentes en sistemas biológicos pero se acumulan en la piel de pacientes que sufren vitiligo, una enfermedad de la piel que conlleva a la interrupción de la síntesis de la melanina causando manchas blancas en la piel. En esta enfermedad las personas no tienen protección contra la radiación UV, justamente por la falta de melanina, por lo tanto es de gran interés estudiar la fotoquímica y propiedades fotosensibilizadoras de las pterinas para la comprensión del mecanismo que tiene esta enfermedad y además determinar el efecto que puede tener este tipo de compuesto sobre diferentes macromoléculas presentes en la piel.

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es identificar los mecanismos implicados en la degradación fotosensibilizada de aminoácidos libres (tirosina (Tyr), histidina (His), metionina (Met)) y péptidos con importancia biológica (α -MSH) por compuestos pterínicos (pterina (Ptr)) en solución acuosa, bajo irradiación UV-A (320 – 400 nm). A continuación se presentan los objetivos específicos con los cuales se dirigió el desarrollo de esta tesis:

- ✓ Estudiar los procesos fotoinducidos en los que los aminoácidos libres y péptidos son alterados químicamente por derivados pterínicos de importancia biomédica en solución acuosa. Realizando a su vez una comparación de los cambios que se generan con los aminoácidos libres y en cadenas peptídicas.
- ✓ Dilucidar el mecanismo general para los procesos fotosensibilizados de aminoácidos y péptidos inducidos por pterinas oxidadas en solución acuosa.
- ✓ Identificar los productos de las reacciones fotosensibilizadas y su distribución bajo distintas condiciones experimentales.

Estructura y diseño de trabajo de tesis

El presente trabajo de Tesis Doctoral se divide en cuatro partes principales, cada una de las cuales está subdividida, a vez, en capítulos; Al final se presenta una conclusión general de los resultados obtenidos.

Parte I: Introducción:

Posee cinco capítulos en los cuales se encuentran los antecedentes publicados. El *Capítulo 1* presenta brevemente algunos aspectos básicos de radiación y fotoquímica, se

explica los distintos mecanismos por los cuales se producen las reacciones fotosensibilizadas. El *Capítulo 2* y *Capítulo 3* incluye la nomenclatura básica, propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas de los compuestos estudiados, además de la participación de las pterinas en los sistemas biológicos. El *Capítulo 4* y *Capítulo 5* resume la información de literatura acerca de aminoácidos y péptidos, además toda la revisión bibliográfica de fotosensibilización de estos compuestos.

Parte II: Materiales y Métodos experimentales:

En esta parte se presenta con detalle la metodología de trabajo y las técnicas experimentales utilizadas.

Parte III y IV: Resultados:

Esta parte corresponde a la presentación, análisis y discusión de los resultados experimentales obtenidos en este trabajo. En el *Capítulo 8*, se presentan los resultados correspondientes a la interacción de los estados singlete y triplete de la pterina por aminoácidos libres. Los *Capítulos 9 – 12* se presentan los resultados obtenidos del estudio de degradación de aminoácidos libres fotosensibilizada por compuestos pterínicos; incluyendo el análisis de productos de reacción y mecanismos implicados en el proceso. En el *Capítulo 13* se realizó el estudio de la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), en donde se evaluó la reacción fotosensibilizada inducida por Ptr y además se observó particularmente el efecto de algunos aminoácidos en la cadena peptídica. Finalmente los *Capítulos 14 - 16* se evaluó la capacidad de la pterina para actuar como un potencial fotosensibilizador de péptidos análogos a la α -MSH, con el fin de identificar el efecto en algunos componentes específicos de la cadena y se realizó una comparación con lo observado con los aminoácidos libres.

Índice general

I. Introducción	1
1. Fundamentos y fotosensibilización	3
1.1 Fotoquímica y Fotofísica	4
1.1.1 Procesos fotofísicos	4
1.1.1.1 Quenching de fluorescencia	6
1.1.2 Procesos fotoquímicos	8
1.2 Fotosensibilización	9
1.2.1 Transferencia de energía	9
1.2.2 Transferencia de electrones	10
1.3 Oxidaciones fotosensibilizadas	11
1.3.1 Mecanismos Tipo I	11
1.3.2 Mecanismos Tipo II	12
1.3.2 Oxígeno molecular singlete	12
1.4 Implicaciones Biológicas	15
1.4.1 Mecanismos del daño al ADN	16
Bibliografía	17
2. Propiedades químicas y bioquímicas de pterinas	19
2.1 Estructura química de las pteridinas	19
2.2 Propiedades ácido-base de las pterinas	21
2.3 Las pterinas en la naturaleza	22
2.3.1 Pigmentos en insectos	22
2.3.2 Pterinas como fotorreceptores	23
2.3.3 Ácido fólico	24
2.3.4 Tetrahidrobiopterina	24
2.4 Vitíligo	26
Bibliografía	29
3. Propiedades espectroscópicas y fotofísicas de las pterinas	31
3.1 Espectro de absorción y fluorescencia	31
3.2 Propiedades de los estados excitados singletes	32
3.3 Propiedades de los estados excitados tripletes	33
3.4 Reactividad fotoquímica de pterinas aromáticas	34
3.5 Propiedades fotosensibilizadoras de pterinas	35
3.5.1 Fotosensibilización de ADN eucariota	35
3.5.2 Fotosensibilización de ADN plásmido	36
3.5.3 Estudios de mecanismos usando nucleótidos	36
3.5.4 Acción Fotodinámica sobre células eucariotas	37
Bibliografía	38
4. Aminoácidos, péptidos y proteínas	39
4.1 Aminoácidos	39
4.1.1 Comportamiento ácido-base	40
4.1.2 Aminoácidos estudiados	41
4.2 Enlace peptídico. Los péptidos	45
4.3 Péptidos con actividad biológica. Hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH)	46
4.3.1.1 Biosíntesis de α -MSH	46
4.3.1.2 Estructura y función de la α -MSH	47
4.4 Proteínas	48
Bibliografía	49
5. Fotosensibilización de proteínas y aminoácidos	51
5.1 Reacciones de fotosensibilización con aminoácidos	52
5.1.1 Reacciones con residuo de triptófano (Trp)	52
5.1.2 Reacciones con residuo de tirosina (Tyr)	53

5.1.3	Reacciones con residuo de histidina (His)	56
5.1.4	Reacciones con residuo de metionina (Met)	57
5.2	Reacciones de fotosensibilización con proteínas	58
5.3	Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas por compuestos pterínicos	60
	Bibliografía	62
II.	Materiales y Métodos Experimentales	65
6.	Preparación e irradiación estacionaria de soluciones	67
6.1	Reactivos	67
6.2	Preparación de soluciones	68
6.2.1	Soluciones stock	68
6.2.2	Soluciones para irradiar	70
6.2.3	Condiciones anaeróbicas y de saturación de O_2	71
6.3	Irradiación estacionaria de las soluciones	72
6.3.1	Sistema de irradiación	72
6.3.2	Metodología general para la toma de las muestras	74
6.4	Experimentos en condiciones especiales para la determinación del mecanismo	75
6.4.1	Experimentos en presencia de yoduro de potasio (KI)	75
6.4.2	Experimentos en presencia de superóxido dismutasa (SOD)	76
6.4.3	Experimentos comparativo en H_2O y D_2O	76
6.5	Actinometría	77
	Bibliografía	80
7.	Técnicas Analíticas y espectroscópicas	81
7.1	Análisis de soluciones irradiadas	81
7.1.1	Espectroscopia UV-Vis	81
7.1.2	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	82
7.1.3	Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas	85
7.1.4	Emisión fluorescente en estado estacionario	88
7.1.4.1	Descripción del equipo	89
7.1.4.2	Espectro de emisión	91
7.1.5	Determinación colorimétrica de H_2O_2	91
7.1.6	Medida electroquímica de oxígeno disuelto	92
7.2	Técnicas espectroscópicas avanzadas	93
7.2.1	Emisión con resolución temporal	93
7.2.3	Laser flash fotólisis (LFP)	96
7.2.2.1	Decaimientos y espectros de especies transitorias	98
	Bibliografía	99
III.	Resultados: Degradación fotosensibilizada de aminoácidos libres	101
8.	Interacción de los estados excitados de la pterina con aminoácidos	103
8.1	Interacción de los estados singlete de la pterina ($^1P_{tr}^*$) por aminoácidos	103
8.2	Interacción de los estados tripletes de la pterina ($^3P_{tr}^*$) por aminoácidos	110
8.2.1	Espectro de absorción de transientes de pterina	110
8.2.1.1	Desactivación de los estados tripletes de pterina por aminoácidos	112
	Bibliografía	114
9.	Degradación fotosensibilizada de tirosina libre	115
9.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar tirosina	115
9.1.1	Análisis espectroscópico	116
9.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	117
9.1.3	Medida electroquímica de la concentración de O_2	119
9.1.4	Controles	120
9.2	Análisis de fotoproductos	121
9.2.1	Cromatografía líquida (HPLC)	121

9.2.2	Fluorescencia	124
9.2.3	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	126
9.3	Determinación del mecanismo de reacción	131
9.3.1	Rol de oxígeno	131
9.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	132
9.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	133
9.3.4	Irradiación en presencia de SOD	135
9.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	136
9.4	Conclusiones	138
	Bibliografía	139
10.	Degradación fotosensibilizada de histidina libre	141
10.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar histidina	142
10.1.1	Análisis espectroscópico	142
10.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	143
10.1.3	Medida electroquímica de la concentración de O_2	146
10.1.4	Controles	147
10.2	Análisis de fotoproductos	148
10.2.1	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	148
10.2.1.1	Medio ácido	149
10.2.1.2	Medio alcalino	150
10.3	Determinación del mecanismo de reacción	152
10.3.1	Rol de oxígeno	152
10.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	153
10.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	154
10.3.4	Irradiación en presencia de SOD	156
10.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	157
10.4	Conclusiones	159
	Bibliografía	160
11.	Degradación fotosensibilizada de metionina libre en presencia de oxígeno	161
11.1	Evaluación de la capacidad de compuestos pterínicos para fotosensibilizar metionina	161
11.1.1	Análisis espectroscópico	162
11.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	163
11.1.3	Medida electroquímica de la concentración de O_2	168
11.1.4	Controles	169
11.2	Análisis de fotoproductos	170
11.2.1	Cromatografía líquida (HPLC)	170
11.2.2	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	171
11.3	Determinación del mecanismo de reacción	175
11.3.1	Rol de oxígeno	175
11.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	176
11.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	177
11.3.4	Irradiación en presencia de SOD	178
11.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	179
11.4	Conclusiones	180
	Bibliografía	181
12.	Degradación fotosensibilizada de metionina libre en ausencia de oxígeno	183
12.1	Evaluación de la capacidad de 6-metilpterina para fotosensibilizar metionina en ausencia de O_2	183
12.1.1	Análisis cromatográfico	184
12.1.2	Controles	185
12.2	Análisis de fotoproductos	186
12.2.1	Cromatografía líquida (HPLC)	186
12.2.2	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	187
12.3	Determinación del mecanismo de reacción	189

12.3.1	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	189
11.3.2	Mecanismo de reacción propuesto	190
12.4	Conclusiones	191
	Bibliografía	192
IV.	Resultados: Degradación fotosensibilizada de aminoácidos en entorno peptídico	193
13.	Degradación fotosensibilizada de α-MSH	195
13.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar α -MSH	195
13.1.1	Análisis espectroscópico	196
13.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	196
13.1.3	Estudios de emisión de fluorescencia	200
13.1.4	Controles	201
13.2	Análisis de fotoproductos	202
9.2.1	Cromatografía líquida (HPLC)	202
9.2.2	Fluorescencia	203
9.2.3	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	204
13.3	Determinación del mecanismo de reacción	208
13.3.1	Rol de oxígeno	208
13.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	209
13.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	210
13.3.4	Irradiación en presencia de SOD	210
13.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	211
13.4	Conclusiones	213
	Bibliografía	213
14.	Degradación fotosensibilizada de triptófano en entorno peptídico	215
14.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar α -MSH _{Y2G}	215
14.1.1	Análisis espectroscópico	216
14.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	217
14.1.3	Estudios de emisión de fluorescencia	219
14.1.4	Controles	220
14.2	Análisis de fotoproductos	220
14.2.1	Cromatografía líquida (HPLC) y análisis de productos aislados	220
14.2.2	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	226
14.3	Determinación del mecanismo de reacción	230
14.3.1	Rol de oxígeno	230
14.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	231
14.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	232
14.3.4	Irradiación en presencia de SOD	234
14.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	235
14.4	Conclusiones	237
	Bibliografía	237
15.	Degradación fotosensibilizada de tirosina en entorno peptídico	239
15.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar α -MSH _{W9G}	239
15.1.1	Análisis espectroscópico	240
15.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	241
15.1.4	Controles	243
15.2	Análisis de fotoproductos	244
15.2.1	Cromatografía líquida (HPLC) y análisis de productos aislados	244
15.2.2	Fluorescencia	245
15.2.3	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	246
15.3	Determinación del mecanismo de reacción	251
15.3.1	Rol de oxígeno	251
15.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	252
15.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	253

15.3.4	Irradiación en presencia de SOD	255
15.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	255
15.4	Conclusiones	257
	Bibliografía	257
16.	Degradación fotosensibilizada de histidina y metionina en entorno peptídico	259
16.1	Evaluación de la capacidad de pterina para fotosensibilizar α -MSH _{(Y2G)(W9G)}	259
16.1.1	Análisis espectroscópico	260
16.1.2	Análisis cromatográfico y formación de H_2O_2	261
16.1.4	Controles	264
16.2	Análisis de fotoproductos	264
16.2.1	Espectrometría de masas (UPLC-MS)	264
16.2.1.1	Medio ácido	266
16.2.1.1	Medio alcalino	269
16.3	Determinación del mecanismo de reacción	269
16.3.1	Rol de oxígeno	269
16.3.2	Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)	270
16.3.3	Contribución de oxidación por 1O_2	272
16.3.4	Irradiación en presencia de SOD	274
16.3.5	Mecanismo de reacción propuesto	276
16.4	Conclusiones	277
	Bibliografía	277
V.	Conclusiones generales	279

Índice de Figuras

Figura 1.1	Diagrama de Jablonski modificado.	5
Figura 1.2	Vías de desactivación química del estado excitado de una molécula.	8
Figura 1.3	Procesos de transferencia de energía.	9
Figura 1.4	Oxidaciones fotosensibilizadas de tipo I y tipo II.	11
Figura 2.1	Estructura química básica de pteridinas.	20
Figura 2.2	Estructuras tautoméricas de las pterinas.	20
Figura 2.3	Nomenclatura y estructura molecular de algunas pterinas oxidadas y dihidroderivados.	21
Figura 2.4	Equilibrio ácido-base de pterinas en solución acuosa de pH entre 4 y 11.	22
Figura 2.5	Estructura química de algunas pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.	23
Figura 2.6	Participación de H ₄ Bip en las hidroxilasas.	25
Figura 2.7	Síntesis de novo, reciclado y regulación de la síntesis de H ₄ Bip. Mecanismo de degradación sufrido por H ₂ Bip bajo irradiación UV-A.	28
Figura 3.1	Espectros de absorción de pterinas aromáticas en solución acuosa	32
Figura 4.1	Estructura básica de los aminoácidos.	40
Figura 4.2	Estado de ionización como función de pH de aminoácidos.	40
Figura 4.3	Espectros de absorción y emisión de Trp.	42
Figura 4.4	Espectros de absorción y emisión de Tyr.	43
Figura 4.5	Espectros de absorción de His en dos condiciones de pH.	44
Figura 4.6	Espectros de absorción de Met.	45
Figura 4.7	Formación del enlace peptídico.	45
Figura 4.8	Biosíntesis del péptido POMC y generación de las hormonas tales como ACTH, α -, β -, γ -MSH.	47
Figura 4.9	Estructura molecular de α -MSH.	48
Figura 5.1	Irradiancia solar espectral en función de la longitud de onda.	51
Figura 5.1	Mecanismo de oxidación de Trp por absorción UV directa y mediante 1O_2 .	53
Figura 5.2	Mecanismo de oxidación de Tyr por absorción UV directa y mediante 1O_2 .	54
Figura 5.3	Mecanismo de oxidación de His mediante 1O_2 .	57
Figura 5.4	Variación de la constante de reacción de histidina para la reacción con oxígeno singlete.	57
Figura 6.1	Espectros de emisión de la lámpara RPR 3500 A.	73
Figura 6.2	Esquema de irradiación.	74
Figura 6.3	Estructura química de <i>Abercrome 540</i> .	78
Figura 6.4	Evolución de los espectros de una solución de <i>Abercrome 540</i> irradiada con una lámpara Rayonet RPR 3500 A.	78
Figura 7.1	Fotografía de los espectrofotómetros utilizados.	82
Figura 7.2	Fotografía del equipo Shimadzu Prominence LC-20A.	84
Figura 7.3	Esquema de un sistema de ionización ESI: electrospray.	86
Figura 7.4	Fotografía del espectrómetro de masas XevoG2QTof (Waters)	88
Figura 7.5	Espectrofluorómetro FluoroMax, Horiba Yvon; y Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorómetro.	90
Figura 7.6	Fotografía del equipamiento utilizado para la medida electroquímica de O_2 .	93
Figura 7.7	Esquema de TCSPC funcionando en modo reverso.	95
Figura 7.8	Diagrama de Jablonski modificado. Evolución temporal de ΔA observada en un experimento típico de fotólisis de destello.	97
Figura 7.9	Esquema del equipo LFP. Fotografía del equipo de fotólisis de destello utilizado.	97

Figura 8.1	Espectros de emisión de soluciones acuosas de Ptr en presencia de aminoácidos.	105
Figura 8.2	Variación de emisión fluorescente en función del tiempo de soluciones de Ptr en presencia de Trp y Met.	106
Figura 8.3	Graficas de Stern-Volmer de soluciones de Ptr en función de la concentración de aminoácido.	108
Figura 8.4	Decaimiento de la absorbancia con el tiempo de solución de Ptr saturada en Ar.	111
Figura 8.5	Espectro de absorción de transientes de soluciones de Ptr saturadas en Ar.	111
Figura 8.6	Decaimiento de los transientes de Ptr registrada a partir de la evolución temporal a $\Delta\lambda 430$ nm.	112
Figura 8.7	Graficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de Ptr por aminoácidos.	113
Figura 9.1	Espectros de absorción de Ptr y Tyr de soluciones acuosas equilibradas con aire a pH=5,5.	116
Figura 9.2	Espectros de absorción de soluciones de Ptr y Tyr irradiadas durante diferentes periodos de tiempo.	116
Figura 9.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y Tyr equilibrada con aire.	117
Figura 9.4	Evolución de la concentración de Tyr, Ptr y H_2O_2 en solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A como una función del tiempo de irradiación.	118
Figura 9.5	Comparación de la concentración de Tyr, medida con el detector HPLC-PDA/FL de una solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A como función del tiempo de irradiación.	119
Figura 9.6	Evolución de la concentración de O_2 en soluciones irradiadas que contienen Ptr y Tyr como función del tiempo.	120
Figura 9.7	Segmento de los cromatogramas de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción.	121
Figura 9.8	Cromatogramas obtenidos por análisis con HPLC-PDA de soluciones irradiadas con y sin patrón L-DOPA.	122
Figura 9.9	Cromatogramas obtenidos por análisis con HPLC-PDA de soluciones irradiadas y con patrón interno L-Dopacroma,.	123
Figura 9.10	Perfiles de concentración de Tyr y formación de Tyr_2 en solución acuosa aireada en función del tiempo de irradiación.	124
Figura 9.11	Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y Tyr, irradiadas a 350 nm.	125
Figura 9.12	Espectros MS de los picos de Tyr y Ptr, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar.	127
Figura 9.13	Espectro de masas de P_1' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire.	128
Figura 9.14	Espectro de masas de P_2' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire.	128
Figura 9.15	Espectro de masas de P_3' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire.	129
Figura 9.16	Espectro de masas de P_4' de soluciones irradiadas de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire.	130
Figura 9.17	Evolución de las concentración de Tyr en soluciones acuosas equilibras con Aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación; Formación de Tyr_2 en soluciones acuosa.	132
Figura 9.18	Evolución de la concentración de Tyr en presencia y ausencia de KI en función del tiempo de irradiación; Formación de Tyr_2 en soluciones acuosa.	133

Figura 9.19	Evolución de la concentración de Tyr en función del tiempo de irradiación de soluciones en D ₂ O y H ₂ O.	134
Figura 9.20	Evolución de la concentración de Tyr en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con Aire en presencia y ausencia de SOD.	136
Figura 10.1	Espectros de absorción de Ptr e His de soluciones acuosas equilibradas con aire. (a) Forma ácida (b) Forma alcalina.	142
Figura 10.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas de His y Ptr equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación.	143
Figura 10.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr e His equilibradas con aire pH = 5,46; detector HPLC-PDA.	144
Figura 10.4	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr e His equilibradas con aire pH = 10,54; detector HPLC-PDA.	145
Figura 10.5	Evolución de las concentraciones de His, Ptr y H ₂ O ₂ en solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A como función del tiempo de irradiación, a) pH 5,46; b) pH 10,54.	146
Figura 10.6	Seguimiento de la concentración de O ₂ en soluciones irradiadas que contienen Ptr e His como función del tiempo, a) pH = 5,48, b) 10,59.	147
Figura 10.7	Espectros MS de los picos correspondientes a His y Ptr, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar.	149
Figura 10.8	Espectro de masas del producto oxidado de las soluciones irradiadas de His en presencia de Ptr equilibradas con aire a pH 5,5.	150
Figura 10.9	Espectro de masas de P ₁ ' obtenido al irradiar soluciones de His en presencia de Ptr equilibradas con aire a pH 10,5.	151
Figura 10.10	Espectro de masas de los dímeros oxidados de His de las soluciones irradiadas equilibradas con aire a pH 10,5.	152
Figura 10.11	Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire, Ar y saturación de O ₂ bajo irradiación UV-A como función del tiempo de irradiación, a) pH 5,46; (b) pH 10,54.	153
Figura 10.12	Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en ausencia y presencia de KI, a) pH 5,61; b) pH 10,59.	154
Figura 10.13	Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación, en H ₂ O y D ₂ O; (a) pH 5,37 / pD 5,17; (b) pH 10,55 / pD 10,05.	155
Figura 10.14	Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación, en presencia y ausencia de SOD; (a) pH 5,43; (b) pH 10,45.	157
Figura 11.1	Espectros de absorción de Ptr y Met de soluciones acuosas equilibradas con aire a pH = 5,5.	162
Figura 11.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Met irradiadas en la presencia de Ptr.	162
Figura 11.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y Met equilibradas con aire; detector HPLC-PDA.	163
Figura 11.4	Espectros de absorción de Mep y Met de soluciones acuosas equilibradas con aire a pH = 5,5.	164
Figura 11.5	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Mep y Met equilibradas con aire; detector HPLC-PDA.	165
Figura 11.6	Evolución de la concentración de Met y Mep de soluciones acuosas aireadas en función del tiempo de irradiación seguida por HPLC-PDA; (Formación de P ₁ y P ₂).	165
Figura 11.7	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Mep y Met equilibradas con aire; burbujeada	166

	periódicamente (Aire/Burb), detector HPLC-PDA.	
Figura 11.8	Consumo relativo de Met y Mep en solución acuosa aireada en función del tiempo de irradiación, Aire/Burb, detector HPLC-PDA; Formación de P_1 y H_2Mep .	166
Figura 11.9	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución anaeróbica (Ar) de Mep y Met. Espectro de absorción del producto formado y del patrón de H_2Mep .	168
Figura 11.10	Evolución de la concentración de O_2 en soluciones irradiadas que contienen Mep y Met como función del tiempo.	169
Figura 11.11	Cromatogramas obtenidos por análisis de HPLC-PDA de soluciones irradiadas y con patrón MetSO, tiempo de irradiación 90 min.	171
Figura 11.12	Cromatogramas UV registrados de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire.	172
Figura 11.13	Espectros de masas registrados de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire.	173
Figura 11.14	Espectro de masas de los productos P_1' de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire.	174
Figura 11.15	Espectro de masas ESI ⁺ extraídos del cromatograma con t_r 1,61 min de soluciones de Met y Mep equilibradas con aire irradiadas durante 60 min.	175
Figura 11.16	Evolución de la concentración de Mep y Met en solución aireadas/burbujeadas con aire/Ar/ O_2 en función del tiempo de irradiación, seguida por el detector HPLC-PDA.	176
Figura 11.17	Evolución de la concentración de Met de soluciones acuosas en condiciones de Aire/Burb en presencia y en ausencia de KI seguida por el detector HPLC-PDA.	177
Figura 11.18	Evolución de la concentración de Met en función del tiempo de irradiación de soluciones en D_2O y H_2O	178
Figura 11.19	Evolución de la concentración de Met en función del tiempo de irradiación de soluciones en presencia y ausencia de SOD.	179
Figura 12.1	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución anaeróbica (Ar) de Mep y Met; detector HPLC-PDA.	184
Figura 12.2	Evolución del consumo de Mep y Met en solución acuosa anaeróbicas en función del tiempo de irradiación, seguida por el detector HPLC-PDA; Formación H_2Mep .	185
Figura 12.3	Espectros de absorción y evolución de la concentración de Mep en función del tiempo de irradiación, saturadas en Ar en ausencia de Met; Espectros de absorción de una solución irradiada de Met con UV-A por distintos periodos de tiempo, saturada con Ar.	186
Figura 12.4	Cromatogramas irradiadas en presencia y ausencia del patrón de H_2Mep .	187
Figura 12.5	Cromatogramas UV registrados de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O_2 .	187
Figura 12.6	Espectro de masas del producto P_1 de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O_2 .	188
Figura 12.7	Espectro de masas del producto H_2Mep de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O_2 .	189
Figura 12.8	Perfiles de concentración de soluciones de Mep y Met en función del tiempo de irradiación, en ausencia de O_2 , en presencia y en ausencia de KI seguida por HPLC-PDA.	190
Figura 13.1	Espectros de absorción de Ptr (-) y α -MSH (-) de soluciones acuosas equilibradas con aire	195
Figura 13.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas. Espectros diferencia; Espectros diferencia normalizados	196
Figura 13.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una	197

	solución de Ptr y α -MSH equilibradas con aire; detector HPLC –PDA.	
Figura 13.4	Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción (P_1 , P_2 y P_3).	197
Figura 13.5	Evolución de la concentración de α -MSH, Ptr y H_2O_2 en solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A como una función del tiempo de irradiación.	198
Figura 13.6	Cromatogramas de fluorescencia registrados a distintos tiempos de una solución de Ptr y α -MSH equilibrada con aire, utilizando como condiciones la emisión del Trp.	199
Figura 13.7	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH equilibrada con aire, utilizando como condiciones la emisión de la Tyr.	200
Figura 13.8	Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH irradiadas a 350 nm.	201
Figura 13.9	Cromatogramas de fluorescencia registrados para soluciones de Ptr y α -MSH equilibradas con aire, utilizando como condiciones la emisión de la Tyr ₂ .	202
Figura 13.10	Cromatogramas registrados por HPLC-PDA de soluciones irradiadas de Ptr y MSH _{Y2G} equilibradas con aire.	203
Figura 13.11	Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH irradiadas a 350 nm. Para tiempo, el espectro de emisión antes de irradiar fue sustraído.	204
Figura 13.12	Espectros de masa correspondiente al ion intacto de la molécula de α -MSH y de los productos generados en la reacción.	206
Figura 13.13.	Espectros de masas de producto dimérico.	207
Figura 13.14	Evolución de las concentración de soluciones acuosas de α -MSH y Ptr equilibras con Aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación.	208
Figura 13.15	Evolución de la concentración de soluciones acuosas de α -MSH y Ptr equilibras con aire en función del tiempo de irradiación en ausencia y presencia de KI.	209
Figura 13.16	Evolución de la concentración de soluciones de α -MSH y Ptr en H_2O/D_2O irradiadas de α -MSH y Ptr en función del tiempo de irradiación.	210
Figura 13.17	Evolución de la concentración de soluciones irradiadas de α -MSH y Ptr en presencia y ausencia de SOD.	211
Figura 14.1	Espectros de absorción de α -MSH _{Y2G} y Ptr a pH ácido de soluciones acuosas equilibradas con aire.	216
Figura 14.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas.	216
Figura 14.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibradas con aire; HPLC-PDA.	217
Figura 14.4	Evolución de la concentración de α -MSH _{Y2G} , Ptr y H_2O_2 de soluciones acuosas equilibradas con aire bajo irradiación UV-A como una función del tiempo de irradiación.	218
Figura 14.5	Cromatogramas de fluorescencia registrados a distintos tiempos de una solución de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibradas con aire, utilizando como condiciones la emisión del Trp.	219
Figura 14.6	Espectro de fluorescencia de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH _{Y2G} irradiadas por diferentes tiempos con las condiciones de emisión del residuo de Trp.	220
Figura 14.7	Segmento de un cromatogramas de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción.	221

Figura 14.8	Cromatogramas registrados de fluorescencia de soluciones irradiadas equilibradas con aire.	222
Figura 14.9	Espectros de emisión del producto P_1 aislado, de soluciones irradiadas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación.	223
Figura 14.10	Cromatogramas registrados de una solución de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibrada con aire irradiada 6 min y luego de su reacción térmica medida por HPLC-PDA	224
Figura 14.11	Cromatogramas registrados con HPLC-FL de soluciones irradiadas de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibradas con aire, utilizando como condiciones la emisión de la NFK.	224
Figura 14.12	Cromatogramas registrados de una solución de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibrada con aire irradiada 6 min.	225
Figura 14.13	Cromatogramas registrados con el HPLC-FL de soluciones irradiadas de Ptr y α -MSH _{Y2G} equilibradas con aire, , utilizando como condiciones la emisión del 5-HTP.	226
Figura 14.14	Cromatogramas de masas registrados de soluciones que contenían α -MSH _{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con aire	227
Figura 14.15	Espectros de masa del pico con t_r 10.8 min correspondientes a α -MSH _{W9G} , registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar	228
Figura 14.16	Espectros de masas de P_1' de soluciones irradiadas de α -MSH _{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con aire	228
Figura 14.17	Espectros de masas de P_2' de soluciones irradiadas de α -MSH _{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con air	229
Figura 14.18	Evolución de las concentración de (a) α -MSH _{Y2G} , (b) Residuo de Trp y (c) NFK de soluciones acuosas equilibras con Aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación	231
Figura 14.19	Evolución de la concentración de (a) α -MSH _{Y2G} , (b) Residuo de Trp y (c) NFK en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibras con Aire en presencia y ausencia de KI	232
Figura 14.20	Evolución de la concentración de (a) α -MSH _{Y2G} , (b) Residuo de Trp y (c) NFK en función del tiempo de irradiación de soluciones en D ₂ O y H ₂ O	233
Figura 14.21	Evolución de la concentración de (a) α -MSH _{Y2G} , (b) Residuo de Trp y (c) NFK en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibras con Aire en presencia y ausencia de SOD.	235
Figura 15.1	Espectros de absorción de α -MSH _{W9G} y Ptr de soluciones acuosas equilibradas con aire.	240
Figura 15.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de α -MSH _{W9G} y Ptr; Espectros de absorción de soluciones irradiadas durante diferentes tiempos de irradiación	240
Figura 15.3	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH _{W9G} equilibradas con aire; HPLC-PDA	241
Figura 15.4	Evolución de la concentración de α -MSH _{W9G} , Ptr y H_2O_2 de soluciones acuosas equilibradas con aire bajo irradiación UV-A como una función del tiempo de irradiación.	242
Figura 15.5	Cromatogramas de fluorescencia registrados a distintos tiempos de una solución de Ptr y α -MSH _{W9G} equilibrada con aire con las condiciones de emisión del residuo de Tyr.	243
Figura 15.6	Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción.	244
Figura 15.7	Cromatogramas de fluorescencia registrados para Tyr ₂ de una solución irradiada. (a) Formación de Tyr ₂ en solución acuosa aireada en función del tiempo de irradiación, seguida por HPLC-FL	245
Figura 15.8	Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y α -	246

	MSH _{W9G} irradiadas a 350 nm. Para cada tiempo, fue sustraído el espectro de emisión del tiempo cero.	
Figura 15.9	Cromatogramas de masas registrados de soluciones que contenían α -MSH _{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire.	247
Figura 15.10	Espectros MS del pico correspondiente a α -MSH _{W9G} , registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar.	248
Figura 15.11	Espectro de masas del producto con t_r 6,45 min de soluciones irradiadas de α -MSH _{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire.	248
Figura 15.12	Espectro de masas del producto con (a) t_r 6,03 min y (b) 5,97 min de soluciones irradiadas de α -MSH _{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire.	249
Figura 15.13	Espectros de masas de los productos con t_r 8,92 min de soluciones irradiadas de α -MSH _{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire.	250
Figura 15.14	Evolución de la concentración de α -MSH _{W9G} , (b) Formación de Tyr ₂ , (c) Formación de producto P ₁ de soluciones acuosas equilibradas con Aire y saturadas con Ar y O ₂ en función del tiempo de irradiación.	252
Figura 15.15	Evolución de la concentración de α -MSH _{W9G} , (b) Formación de Tyr ₂ , (c) Formación de producto P ₁ en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibradas con Aire en presencia y ausencia de KI.	253
Figura 15.16	Evolución de la concentración de α -MSH _{W9G} , (b) Formación de Tyr ₂ , (c) Formación de producto P ₁ en función del tiempo de irradiación de soluciones en D ₂ O y H ₂ O	254
Figura 15.17	Perfiles de concentración de soluciones de α -MSH _{W9G} y Ptr en función del tiempo de irradiación equilibradas con aire en presencia y ausencia de SOD, (a) Evolución de la concentración de α -MSH _{W9G} , (b) Formación de Tyr ₂ , (c) Formación de producto P ₁ .	255
Figura 16.1	Espectros de absorción de Ptr y α -MSH _{(Y2G)(W9G)} de soluciones acuosas equilibradas con aire	260
Figura 16.2	Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} y Ptr equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación	261
Figura 16.3.	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH _{(Y2G)(W9G)} equilibradas con aire a pH 5,5.	262
Figura 16.4.	Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH _{(Y2G)(W9G)} equilibradas con aire a pH 10,5.	262
Figura 16.5.	Evolución de la concentración de Ptr y α -MSH _{(Y2G)(W9G)} y H ₂ O ₂ de solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación como función del tiempo de irradiación, (a) pH 5,39; (b) pH 10,41.	263
Figura 16.6.	Cromatogramas de masas registrados para las soluciones equilibradas en aire de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} y Ptr, a dos condiciones de pH	265
Figura 16.7.	Espectro MS de los productos e soluciones irradiadas por 60 min de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} en presencia de Ptr equilibradas con aire a pH 5,5.	267
Figura 16.8.	Espectro MS de los productos e soluciones irradiadas por 60 min de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} en presencia de Ptr equilibradas con aire a pH 10,5.	268
Figura 16.9	Evolución de la concentración de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} y de los productos generados de soluciones acuosas equilibradas con aire, Ar y saturación de O ₂ bajo irradiación.	270
Figura 16.10	Evolución de la concentración de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} y de los productos generados en presencia y ausencia de KI	271
Figura 16.11	Evolución de la concentración de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} de soluciones acuosas equilibradas con aire en H ₂ O y D ₂ O bajo irradiación UV-A como función del tiempo de irradiación y formación de productos.	273
Figura 16.12	Evolución de la concentración de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} de soluciones acuosas equilibradas con aire, en presencia y ausencia de SOD.	275

Índice de Tablas

Tabla 3.1	Longitud de onda de los máximos de emisión, rendimiento cuántico de fluorescencia, tiempo de vida de fluorescencia y rendimiento cuántico de producción de 1O_2 de algunas pterinas aromáticas.	33
Tabla 6.1	Coefficientes de extinción molar de aminoácidos a sus respectivas longitudes de onda.	68
Tabla 6.2	Coefficientes de extinción molar de péptidos mutados a sus respectivas longitudes de onda.	69
Tabla 7.1	Composición de las mezclas utilizadas como fase móvil para los diferentes experimentos realizados.	85
Tabla 8.2	Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} y K_S) de soluciones de Ptr en función de la concentración de aminoácido.	109
Tabla 8.3	Valores de constantes de Stern-Volmer, de desactivación del estado triplete de la Ptr por aminoácidos.	113
Tabla 9.1	Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de Tyr inducida por Ptr en presencia de O_2 .	130
Tabla 10.1	Velocidades experimentales y calculadas de consumo de His durante la reacción fotosensibilizada de Ptr (100 μ M) de soluciones aireadas.	156
Tabla 14.1	Velocidades iniciales de consumo de α -MSH _{Y2G} experimental y calculada para la reacción de 1O_2 y α -MSH _{Y2G} .	234
Tabla 15.1	Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de Tyr inducida por Ptr en presencia de O_2 .	251
Tabla 15.2	Velocidades iniciales de consumo de α -MSH _{W9G} experimental y calculada para la reacción de 1O_2 y α -MSH _{W9G} .	254
Tabla 16.1	Velocidades experimentales y calculadas de consumo de α -MSH _{(Y2G)(W9G)} durante la irradiación en presencia de Ptr (50 μ M) de soluciones aireadas.	274

Índice de abreviaturas

Ptr	pterina
Mep	6-metil-pterina
H ₂ Mep	6-metil-7, 8 dihidropterina
Lum	lumazina
H ₄ Bip	5, 6, 7, 8, tetrahidrobiopterina
Bip	6-biopterina
Fop	6-formilpterina
Cap	6-carboxipterina
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
His	histidina
Phe	fenilalanina
Met	metionina
Cys	cisteína
Gly	glicina
α -MSH	hormona estimulante de los α -melanocitos
α -MSH _{Y2G}	mutación de la tirosina en la posición 2 por glicina sobre la hormona estimulante de los α -melanocitos
α -MSH _{W9G}	mutación del triptófano en la posición 9 por glicina sobre la hormona estimulante de los α -melanocitos
α -MSH _{W9G}	mutación de la tirosina en la posición 2 y el triptófano en la posición 9 por glicina sobre la hormona estimulante de los α -melanocitos
L-DOPA	L-3, 4 dihidroxifenilalanina
Tyr ₂	dímeros de tirosina
MetSO	sulfóxido de metionina
MetSO ₂	metionina sulfóna
NFK	N-formil-quinurenina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
Kyn	L-quinurenina
ADN	ácido desoxiribonucleico
LYS	lisozima
HSA	albumina de suero humano
BSA	albúmina de suero bovino
MB	azul de metileno
dAMP	2' desoxiadenosina 5' monofosfato
dGMP	2' desoxiguanosina 5' monofosfato
LFP	fotólisis de destello láser
MS	espectrometría de masas
ESI	ionización electrospray
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
PDA	detector de arreglo de diodos
FL	detector de fluorescencia
TOF	tiempo de vuelo
EPR	resonancia paramagnética electrónica
SOD	superóxido dismutasa
IC	conversión interna
ISC	cruce intersistemas
VR	relajación vibracional
Sens	fotosensibilizador
UV-Vis	ultravioleta-visible
ROS	especies reactivas del oxígeno

Nomenclatura

Φ_T	rendimiento cuántico
Φ_T	rendimiento cuántico de producción de estados excitados tripletes
Φ_Δ	rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete
Φ_F	rendimiento cuántico de fluorescencia
τ	tiempo de vida del estado excitado
τ_Δ	tiempo de vida del oxígeno singlete
τ_F	tiempo de vida de fluorescencia
τ^0	tiempo de vida de la especie emisora
k_{tF}	constante de velocidad de desactivación total de fluorescencia
k_q	constante biomolecular de desactivación física
k_r	constante de reactividad química
k_t	constante de desactivación total
K_{SV}	constante de Stern-Volmer
λ	longitud de onda
λ_{ana}	longitud de onda de análisis
λ_{em}	longitud de onda de emisión
λ_{exc}	longitud de onda de excitación
λ_F	longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia
λ_P	longitud de onda del máximo de emisión de fosforescencia
ε	coeficiente de absorción molar
1O_2	oxígeno molecular singlete
$O_2^{\bullet-}$	anión superóxido
I_F	intensidad de emisión fluorescente
$\left(\frac{d[Tyr]}{dt}\right)_{0,calc}$	velocidad inicial de consumo de Tyr calculada para la reacción química entre Tyr y el oxígeno singlete
$\left(\frac{d[Tyr]}{dt}\right)_{0,exp}$	velocidad inicial de consumo de Tyr calculada por HPLC
m/z	relación masa/carga
S_1	estado excitado singlete
T_1	estado excitado triplete
Sens*	sensibilizador en un estado electrónicamente excitado
$^3Pt^*$	estado excitado triplete de pterinas oxidadas
$q_{p,\lambda}$	flujo fotónico
$q_{p,\lambda}$	densidad de flujo fotónico
τ_{Tc}	tiempo de vida corto del estado excitado triplete
τ_{TL}	tiempo de vida largo del estado excitado triplete
t_f	tiempo de formación
t_{irr}	tiempo de irradiación
t_r	tiempo de retención

PARTE I

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Fundamentos Fotoquímicos y Fotosensibilización

La mayor parte de la radiación del sol y del espacio exterior llega hasta la superficie de la tierra de forma inalterada, es decir, el sol abarca radiaciones que van desde rayos gama hasta las ondas de radiofrecuencia¹. Sin embargo, sólo una porción de esta radiación emitida llega a la superficie de la tierra, debido a la presencia de compuestos, capaces de absorber parte de esta radiación, los cuales sirven como barrera entre esta radiación y la tierra.

En función de cómo las moléculas situadas en la superficie terrestre reciben la radiación solar, se pueden distinguir varios tipos de radiación, entre los que se puede mencionar radiación directa, radiación difusa y radiación reflejada. Esta radiación no es distribuida de igual manera en la superficie terrestre, debido a que depende de diferentes factores, tales como composición de la atmósfera, posición geográfica y época del año, entre otras.

La distribución espectral de la radiación solar es dividida en radiación infrarroja, visible y UV. Esta última, aunque no representa la mayor parte de la radiación incidente sobre la tierra, es la más energética y, por ende, es la más nociva para los sistemas biológicos. La radiación UV de acuerdo a su energía se divide en las siguientes regiones:

- ✓ *Radiación UV-C*: Esta región comprende las longitudes de onda entre 200 y 280 nm aproximadamente. No llega a la tierra porque es absorbida por el ozono (O_3) de la atmósfera, por lo tanto no llega a causar daño directo².
- ✓ *Radiación UV-B*: Comprende la región del espectro entre 280 y 320 nm aproximadamente. Esta radiación es parcialmente absorbida por el ozono y, por lo tanto, llega a la superficie de la tierra. Representa sólo el 5% de la UV y el 0.25% de toda la radiación solar que llega a la superficie de la Tierra.
- ✓ *Radiación UV-A*: Es la radiación solar menos nociva. Con longitudes de onda entre los 320 y 400 nm y la mayoría de estos rayos llega a la superficie terrestre.

1.1 Fotoquímica y Fotofísica

La interacción entre la radiación electromagnética en el rango UV-visible y la materia, abarca un gran número de eventos entre los que se pueden destacar los procesos fotofísicos y fotoquímicos. Estos procesos inician con la absorción de un cuanto de luz o de fotones por una molécula en estado basal, con lo que accede a un estado electrónicamente excitado de mayor energía. En este estado electrónico excitado, la molécula se encuentra en una situación inestable respecto de su estado basal, motivo por el cual puede perder el exceso de energía de diferentes modos. Si la molécula sufre una transformación química, entonces se denomina proceso fotoquímico, por otra parte, si la molécula no sufre un cambio químico y simplemente se desactiva mediante algún evento físico, se habla entonces de un proceso fotofísico.

1.1.1 Procesos fotofísicos

Para las moléculas orgánicas cuyo estado basal es de capa cerrada, con todos sus electrones apareados y de multiplicidad singulete, la absorción directa de radiación conduce al primer estado excitado singulete S_1 . Desde este estado puede decaer por diferentes caminos de relajación física, el más favorable dependerá de diferentes factores, entre los que se encuentra el tipo de molécula, propiedades del medio, naturaleza de los estados electrónicos. Estas vías son por lo general rápidas y pueden ser clasificadas de la siguiente manera: **Transiciones radiativas**, en las cuales la molécula excitada puede emitir radiación electromagnética a una determinada longitud de onda y volver a su estado fundamental. La energía adquirida en el proceso de excitación, es emitida a una mayor longitud de onda (menor energía) en comparación con la utilizada para generar el estado excitado, según el desplazamiento de Stokes de la molécula. **Transiciones no radiativas**, en las que la pérdida de energía ocurre sin emisión de radiación. **Procesos de apagamiento ó quenching**, involucra la transferencia de energía de la molécula excitada a otras moléculas que se encuentren presentes en el medio. El diagrama de Jablonski modificado (Figura 1.1) representa los niveles de energía, transiciones radiativas con flechas en línea recta, transiciones no radiativas con flechas

onduladas y los niveles vibracionales asociados a cada estado son representados con líneas horizontales.

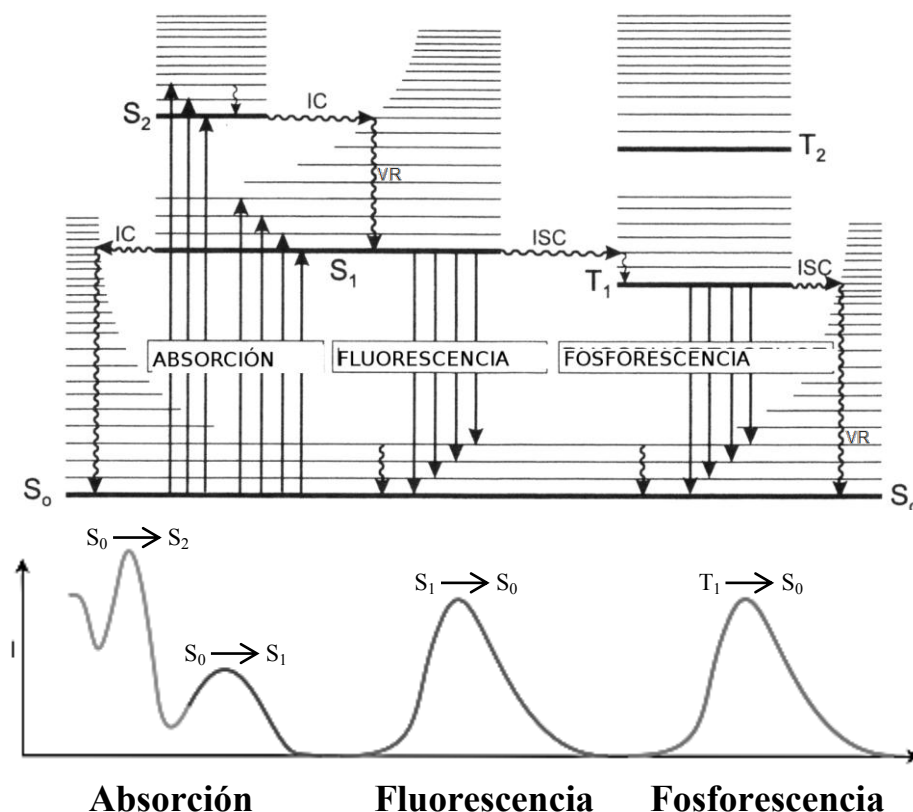


Figura 1.1 Diagrama de Jablonski modificado. Descripción de los diferentes procesos fotoquímicos que pueden tener lugar tras la excitación inicial desde el estado fundamental

Cuando se produce la absorción de un fotón desde el estado singlete S_0 , se promueve un electrón a un orbital de mayor energía. Si no existe cambio de multiplicidad, se alcanza un estado electrónico S_1 . En caso contrario el estado electrónico alcanzado será triplete T_1 . Este último estado posee menor energía que el estado excitado S_1 . En general, las transiciones del tipo S_0 a S_1 poseen bandas de absorción más intensas. En el caso de las transiciones $S_0 \rightarrow T_1$ están “prohibidas por spin”, y por consiguiente son transiciones débiles ya que tienen poca probabilidad de ocurrir.

Después de la excitación la molécula puede decaer a través de una transición no radiativa al nivel vibracional más bajo del estado excitado en el que se encuentre, y desde allí puede volver al estado fundamental (S_0) por emisión, en el caso del estado excitado S_1 , esta emisión se denomina **fluorescencia**, la cual es una transición permitida y rápida. En el caso que la transición radiativa sea desde T_1 se denomina **fosforescencia**,

la cual puede ocurrir en menor intensidad y más lenta que la fluorescencia. En ambos casos la emisión de la radiación se observa a longitudes de onda mayores que la radiación absorbida inicialmente³ (desplazamiento de Stokes).

Por otra parte, las transiciones no radiativas involucran conversiones de un estado a otro, sin cambio de energía en la molécula. Estas conversiones pueden ser entre estados de igual multiplicidad, denominándose *conversión interna (IC)*, o de distinta multiplicidad, la cual denominamos *cruce intersistemas (ISC)*. Estas transiciones dejan a la molécula con un exceso de energía vibracional, la cual se disipa rápidamente por colisiones del solvente, en un proceso denominado *relajación vibracional (VR)*.

1.1.1.1 Quenching de fluorescencia

Los procesos de apagamiento o *quenching* de fluorescencia se producen cuando en el medio de reacción está presente una molécula capaz de interactuar con el estado excitado, lo cual lleva a un camino de desactivación que compite con la emisión. Este proceso involucra generalmente transferencia de energía de la molécula excitada (A^*) a otra molécula en una colisión (Q) (Reacción 1.1). Consecuencia de esto, se disminuye la radiación en una cantidad dependiendo de la concentración del apagador, además, la presencia del desactivador aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión. La Ecuación (1.2) representa la velocidad de dicho proceso, donde k_q es la constante de velocidad biomolecular de desactivación.



$$v = k_q [A^*] [Q] \quad (1.2)$$

Dado un proceso de *desactivación dinámica*, puede calcularse la constante de velocidad del proceso de desactivación analizando espectros de emisión del compuesto a estudiar en presencia y en ausencia del desactivador. La Ecuación (1.3), representa la expresión denominada de Stern-Volmer:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau^0 [Q] \quad (1.3)$$

Donde I_F^0 e I_F son las intensidades de la emisión fluorescente en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del desactivador, k_q es la constante biomolecular de desactivación, y τ^0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora. Esta ecuación se puede deducir planteando el estado estacionario para la especie excitada en presencia del desactivador³.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer (I_F^0/I_F vs $[Q]$) permite obtener valiosa información. Por ejemplo, el determinar K_{SV} da un método indirecto para obtener el τ^0 si se conoce o puede calcularse k_q , o por el contrario, se puede determinar k_q si se conocen τ^0 . Por otro lado, una gráfica lineal de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora es denominado “quenching colisional o dinámico”. Por el contrario, si la gráfica de Stern-Volmer no es lineal puede suponerse la presencia de dos poblaciones distintas de fluoróforo en este caso se llama “quenching estático”. Este caso, generalmente se produce como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre la molécula emisora y la molécula quencher (Ecuación 1.4).



La dependencia de la intensidad de la fluorescencia (I_F) con la concentración de quencher puede deducirse considerando la constante de asociación (K_s):

$$K_s = \frac{[A - Q]}{[A][Q]} \quad (1.5)$$

Si el complejo de A-Q no emite, la ecuación de Stern-Volmer viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_s[Q] \quad (1.6)$$

Puede apreciarse que, un proceso de quenching estático también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal. Sin embargo, en este caso, K_{SV} es igual a K_s .

1.1.2 Procesos fotoquímicos

Después de la absorción de radiación electromagnética por parte de la molécula, esta adquiere una energía adicional lo que aumenta las posibilidades de reacción respecto de la misma molécula en estado basal⁴. El exceso de energía puede generar una reacción química, lo que generalmente se conoce como un **proceso fotoquímico**. Es importante mencionar que la reactividad de una molécula en estado fundamental es diferente a la reactividad en un estado electrónicamente excitado. Las reacciones fotoquímicas pueden ocurrir por diferentes caminos, los cuales se pueden clasificar según el esquema presentado en la Figura 1.2. En las **reacciones de disociación**, si la energía es suficiente, puede generar el rompimiento de un enlace químico y llevar a la fragmentación de la molécula excitada.

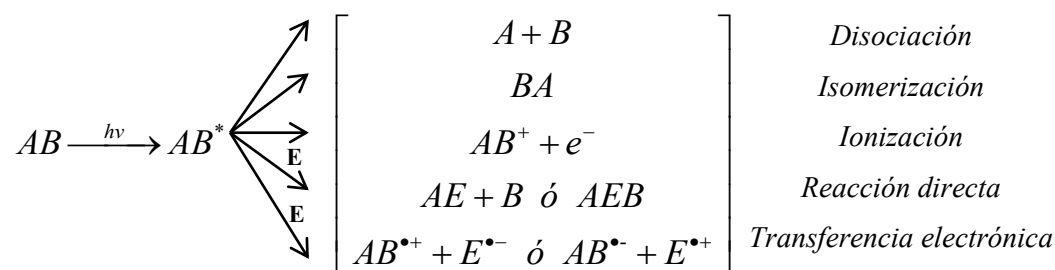


Figura 1.2. Tipos de reacciones fotoquímicas a partir del estado excitado de una molécula “AB”.

Cuando una molécula se encuentra en un estado electrónicamente excitado, una parte de ella puede generar reacciones con otra parte de la misma molécula y por lo tanto conllevando a cambios estructurales y/o **procesos de isomerización**. En el **proceso de ionización**, podría ocurrir que la energía de radiación lleve a la separación de un electrón y por lo tanto, la ionización de la molécula excitada, lo que podría generar también la reacción con otra molécula. En las reacciones o procesos intermoleculares, interviene una segunda molécula “E”, y se puede generar una **reacción directa** entre la molécula excitada y “E” o procesos de **transferencia electrónica** entre ambas especies generando sus respectivos radicales.

1.2 Fotosensibilización

La fotosensibilización abarca un gran número de procesos fotoquímicos, en donde una molécula puede sufrir alteraciones fotoquímicas y/o fotofísicas, debido a la absorción de luz por otra especie química, denominada fotosensibilizador (*Sens*)^{5,6}. La luz natural o artificial, es suficiente para proporcionar a algunos cromóforos, dosis eficaces de UVA, UVB y/o radiación Vis, que desencadenan procesos de fotosensibilización

1.2.1 Transferencia de energía

La transferencia de energía es un proceso donde una molécula que esta excitada se desactiva, transfiriendo la energía adquirida a una segunda especie química (Figura 1.3), la transferencia intermolecular de energía de una especie a otra, conduce a la excitación de especies no absorbentes (a una determinada longitud de onda), lo cual puede conducir a reacciones químicas que no son posibles por absorción directa de la luz. En diferentes vías de excitación, puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa y por lo tanto otras reacciones químicas

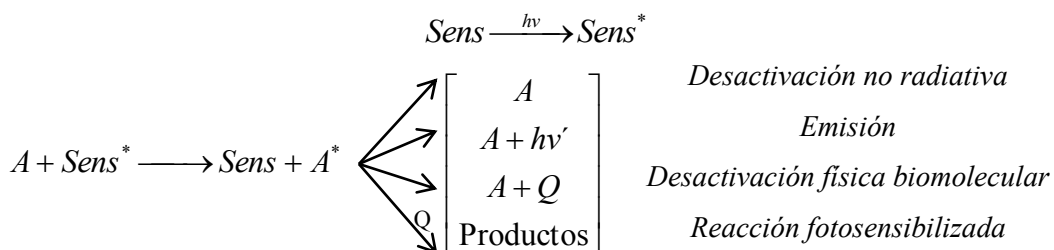


Figura 1.3. Procesos de transferencia de energía

Este mecanismo es responsable de reacciones fotosensibilizadas y de procesos de desactivación biomolecular de emisión. En la Figura 1.3 se presenta la secuencia de reacciones involucradas en este mecanismo. En principio, el fotosensibilizador (*Sens*) adquiere suficiente energía a partir de la absorción de un cuanto de luz, lo que hace que pase a un estado electrónicamente excitado (*Sens*^{*}). Esa energía se la transfiere a la molécula A, para generar un estado electrónicamente excitado (*A*^{*}), lo que conlleva a que *Sens*^{*} regrese al estado fundamental. Es claro que la transferencia de energía es

menor a la absorción inicial, ya que en el proceso se generaron pérdidas de energía por otras vías, tales como relajación o pérdida de energía vibro-rotacional. Luego de este proceso, A^* puede volver a su estado fundamental por una **desactivación no radiativa**, por las diferentes vías fotofísicas ó fotoquímicas mencionadas en la sección anterior. La transferencia de energía es una vía alternativa de excitación, ya que puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa, y por lo tanto, puede dar lugar a distintas reacciones químicas⁷. La transferencia de **energía radiativa**, se da por la desactivación radiativa de $Sens^*$ y absorción de la radiación emitida.

Los procesos de fotosensibilización son muy importantes en el campo de la química orgánica para generar estados tripletes. Esto se debe a que muchas moléculas orgánicas no pueden acceder fácilmente al estado triplete por absorción directa desde el estado basal singlete, a causa de sus bajos rendimientos cuánticos de producción de estados tripletes. Por otra parte, la química de estados tripletes y singletes es, a menudo, muy diferente y, frecuentemente, se necesita generar estados tripletes para su estudio o para producir reacciones particulares. Sin embargo, la transferencia de energía entre moléculas resulta ser un camino eficiente para obtener moléculas en estado triplete. La eficiencia del proceso depende de la configuración de spin y de la energía relativa de los estados excitados de ambos componentes. Otro caso que es muy importante es la excitación fotosensibilizada del O_2 para generar oxígeno molecular singlete (1O_2), la cual es una especie muy reactiva que participa en el estrés oxidativo en sistemas biológicos, el cual será tratado en secciones posteriores.

1.2.2 Transferencia de electrones

Las moléculas excitadas pueden llegar a sufrir diferentes cambios con respecto a su estado fundamental, como puede ser su potencial redox. La oxidación ó reducción de una especie química, por reacción con otra especie, se denomina transferencia de electrones fotosensibilizada. El fundamento principal se basa en los electrones cedido (o aceptado) por una molécula excitada hacia (o desde) otro compuesto en su estado fundamental, dependiendo de los potenciales redox de cada uno de los compuestos en reacción. Este proceso conlleva a la generación del radical anión y catión de las dos especies involucradas, o por una abstracción de hidrógeno generando radicales neutros.

Los radicales pueden sufrir diferentes reacciones que dependerán de sus propiedades, la presencia de otros compuestos en el medio y otras condiciones experimentales.

1.3 Oxidaciones fotosensibilizadas

Las fotooxidaciones son un conjunto de procesos fotoinducidos de gran importancia en sistemas biológicos. Además, si este proceso ocurre en una molécula como resultado de la absorción de radiación por otra, el proceso es denominado oxidación fotosensibilizada. Las oxidaciones fotosensibilizadas que ocurren en presencia de oxígeno se esquematizan en la Figura 1.4. El sensibilizador excitado puede desactivarse mediante dos tipos de procesos, según reaccione con el oxígeno o no. Estos mecanismos están clasificados por C. S. Foote como fotooxidaciones de Tipo I y de Tipo II⁸. En principio el sensibilizador absorbe radiación y se genera el estado excitado ($Sens^*$), desde este punto puede reaccionar con el sustrato ó solvente (mecanismo Tipo I) y/ó con el O_2 (mecanismo Tipo II).

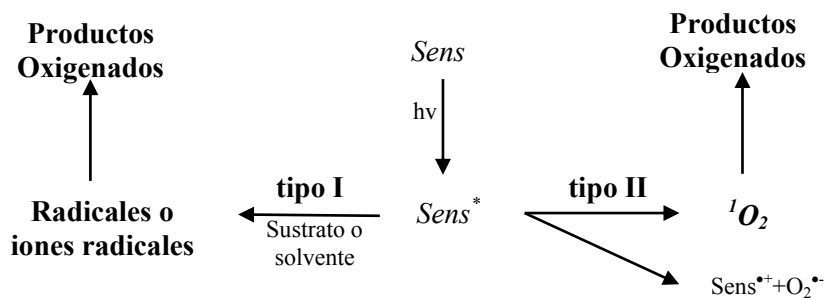
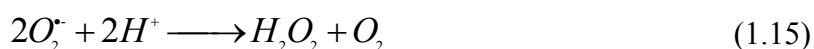
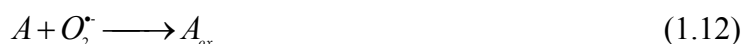
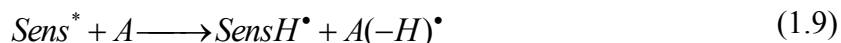
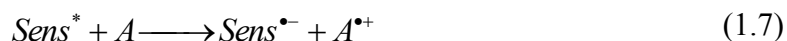


Figura 1.4 Oxidaciones fotosensibilizadas de tipo I y tipo II

1.3.1 Mecanismos Tipo I

En este tipo de mecanismo, el sensibilizador en estado excitado reacciona con otro sustrato (incluido el disolvente) mediante transferencia de electrones o abstracción de hidrógeno. Los procesos que conllevan a la generación de radicales (anión ó catión) ó la abstracción de hidrógeno, se esquematizan en las Reacciones (1.7) a (1.15). Comúnmente, en sistemas biológicos, los sensibilizadores actúan como aceptores de electrones, mientras que sustratos, como nucleótidos y aminoácidos, generalmente ceden electrones llevando a la formación de los correspondientes radical anión y radical

cación. Dependiendo de las constantes de disociación y del pH, el radical catión puede perder un protón para formar el radical neutro. Por otra parte, el radical anión generalmente suele reaccionar con el O_2 disuelto en el medio produciendo el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Reacción (1.11)), el cual puede reaccionar para formar productos oxigenados (A_{ox}) (Reacción (1.12) a (1.14)), o puede desproporcionarse a H_2O_2 (Reacción (1.15)).



1.3.2 Mecanismos Tipo II

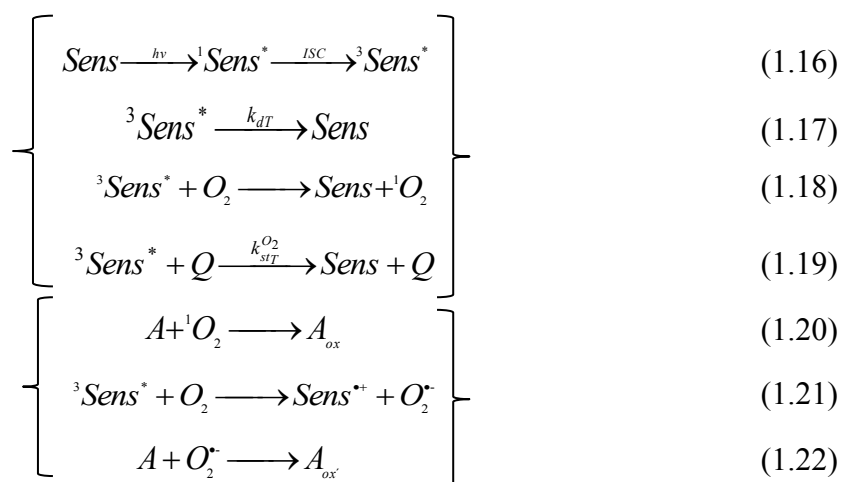
En este tipo de mecanismos está involucrada la producción de 1O_2 a través de procesos de transferencia de energía. En este proceso se forma el estado excitado triplete del sensibilizador (Reacción (1.16)), el cual posteriormente le transfiere la energía al O_2 disuelto en el medio, generando 1O_2 (Reacción (1.17)). Después esta especie, que es altamente oxidante, reacciona con el sustrato generando productos oxigenados (Reacción (1.18)). También, el decaimiento de esta especie, tiene una componente radiativa con emisión en la región del IR (1270 nm).

1.3.3 Oxígeno Molecular Singulete

El primer estado excitado del oxígeno molecular, denominado oxígeno molecular singlete (1O_2) debido a su multiplicidad, es una especie bastante reactiva debido a su

exceso de energía (22.4 kcal). La distribución electrónica que corresponde a esta especie excitada, presenta en su último nivel de energía los dos electrones con espines opuestos en el mismo orbital. El otro estado excitado del oxígeno molecular, el $O_2 (^1\Sigma_g)$ (37.5 kcal), también presenta multiplicidad singlete pero con los electrones desapareados; es de muy corta vida y se relaja rápidamente al 1O_2 . Por lo anterior, el primer estado excitado del oxígeno molecular es el que se conoce comúnmente como oxígeno molecular singlete y es el estado excitado del oxígeno molecular que tiene mayor relevancia en el campo de la biología. Aun cuando las transiciones a los primeros estados excitados son permitidas por el momento dipolar, son débiles y de baja intensidad al ser prohibidas por el momento dipolar eléctrico y por espín. En general, es posible señalar que el 1O_2 podrá participar en una serie de reacciones que son prohibidas por espín para el oxígeno en estado basal, al mismo tiempo, su carácter diamagnético lo diferencia ampliamente del oxígeno en estado basal, pues este último posee la reactividad propia de una especie dirradicalaria.

Un mecanismo de generación fotosensibilizada de oxígeno molecular singlete (1O_2), comienza con la transferencia de energía de una molécula excitada electrónicamente ($Sens^*$) al oxígeno disuelto en el medio. Debido a esta reacción, el sensibilizador puede volver a su estado fundamental y el O_2 queda en su primer estado excitado, que corresponde al estado singlete (Reacciones (1.16) y (1.20))



Suponiendo que la reacción se haga en ausencia de un apagador, el rendimiento cuántico podría expresarse de la siguiente manera:

$$\Phi_A^0 = \Phi_T \varphi_{et}^0 \quad (1.23)$$

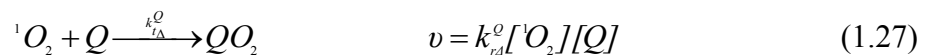
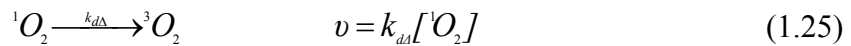
donde Φ_T es el rendimiento cuántico de producción de estados excitados tripletes, φ_{et}^0 es la eficiencia para la transferencia de energía desde el estado triplete del sensibilizador al O_2 para la producción de oxígeno singlete en ausencia de desactivador (Q) y se puede definir de la siguiente manera:

$$\varphi_{et}^0 = \frac{k_{etT}^{O_2} [^3O_2]}{k_{dA} + k_{etT}^{O_2} [^3O_2]} \quad (1.24)$$

k_{etT} es la constante de velocidad de transferencia de energía, k_{dA} es la constante de decaimiento unimolecular del triplete del sensibilizador en ausencia de O_2 y $k_{etT}^{O_2}$ es la constante de velocidad de desactivación total del triplete y del sensibilizador por O_2 .

La desactivación del 1O_2 puede ocurrir en forma no radiativa o radiativa. En presencia de otra sustancia capaz de actuar como desactivador, deben considerarse otras vías de desactivación del 1O_2 por reacción química y por interacción física.

El siguiente conjunto de ecuaciones muestran las reacciones correspondientes a cada una de estas vías de desactivación junto con su correspondiente expresión de velocidad:



En una solución que contiene sensibilizador de 1O_2 que está absorbiendo radiación, la velocidad de generación de 1O_2 viene dada por la Ecuación (1.28), donde Φ_A es el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 del sensibilizador.

$$\frac{\partial [^1O_2]}{\partial t} = \Phi_A q_{p,\lambda}^V \quad (1.28)$$

Por otra parte, puede existir una transferencia de electrones desde el sensibilizador hacia el O_2 , formando el par radical del sensibilizador y el sustrato, las cuales posteriormente pueden oxidar al sustrato (Reacción (1.20) y (1.22)). Es importante aclarar, que de acuerdo a la clasificación de Foote⁸, en este mecanismo puede generarse radicales como

O_2^* , al igual que en los mecanismos Tipo I, debido que el sensibilizador excitado reacciona directamente con el O_2 .

En experimentos de irradiación continua, la concentración de sensibilizador, no cambia y la velocidad de producción de 1O_2 es constante. Por lo tanto, la velocidad de consumo de 1O_2 es igual a la suma de todas la vías de desactivación planteadas en el las Ecuaciones (1.25) a (1.27). En una solución irradiada de un fotosensibilizador en forma estacionaria la concentración de 1O_2 puede calcularse de la siguiente manera:

$$\frac{\partial [^1O_2]}{\partial t} = (\Phi_{\Delta} q_{p,\lambda}^V) - (k_{d\Delta} [^1O_2]) - (k_{p\Delta} [^1O_2]) - (k_{q\Delta}^Q [^1O_2][Q]) - (k_{r\Delta}^Q [^1O_2][Q]) = 0 \quad (1.29)$$

Despejando $[^1O_2]_{ss}$ de la Ecuación (1.30) se obtiene:

$$[^1O_2]_{ss} = \frac{\Phi_{\Delta} q_{p,\lambda}^V}{(k_{d\Delta} + k_{p\Delta} + k_{q\Delta}^Q [Q] + k_{r\Delta}^Q [Q])} = \Phi_{\Delta} q_{p,\lambda}^V \tau_{\Delta} \quad (1.30)$$

donde τ_{Δ} es el tiempo de vida del 1O_2 , en presencia de Q

$$\tau_{\Delta} = \frac{1}{(k_{d\Delta} + k_{p\Delta} + k_{r\Delta}^Q [Q])} \quad (1.31)$$

En ausencia de Q, la concentración de 1O_2 en estado estacionario viene dado por la Ecuación (1.32)

$$[^1O_2]_{ss}^0 = \frac{\Phi_{\Delta}^0 q_{p,\lambda}^V}{(k_{d\Delta} + k_{p\Delta})} = \Phi_{\Delta}^0 q_{p,\lambda}^V \tau_{\Delta}^0 \quad (1.32)$$

donde τ_{Δ}^0 es el tiempo de vida del 1O_2 , en ausencia de un desactivador.

Todos los experimentos para el cálculo de 1O_2 se realizaron en agua deuterada, debido que el tiempo de vida del 1O_2 en D_2O ($\tau_{\Delta}^{D_2O} = 62 \mu s$) es mayor que en H_2O ($\tau_{\Delta}^{H_2O} = 3-4 \mu s$)^{9,10,11}.

1.4 Implicaciones Biológicas

La radiación electromagnética puede producir modificaciones químicas en las moléculas de ADN, lo cual puede generar diferentes alteraciones a nivel celular¹². En general, la muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: apoptosis ó necrosis. La primera, es un mecanismo de muerte programado que evita el derrame del contenido de la célula y, por lo tanto, no daña el entorno. Por otra parte, la necrosis es la muerte patológica de una célula o tejido. Si el daño en el material genético es menor al necesario para provocar la muerte, las consecuencias para la célula dependerán del tipo y magnitud de las lesiones.

La radiación UV produce mutaciones y como consecuencia de las mismas genera procesos neoplásicos en mamíferos. La generación de cáncer debido a la radiación UV a menudo involucra la inactivación de un grupo de genes supresores de tumores, entre los que se puede mencionar el gen *p53*, el cual protege a la célula del estrés producido por la radiación u otros factores. Además también puede existir la sobreexpresión de protooncogenes, entre los que se puede mencionar el gen *ras*¹³.

Los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN son más eficientes frente a lesiones originadas por radiación UV-B que UV-A¹⁴. En respuesta a la exposición solar, la piel puede pigmentarse y puede llegar a aumentar su espesor. Estos mecanismos le dan protección a la piel frente a nuevas exposiciones a la radiación UV¹⁵. En el ser humano, los efectos biológicos provocados por la exposición solar están determinados por la longitud onda de los fotones solares incidentes y la estructura química de los cromóforos presentes en la piel¹⁶.

1.4.1 Mecanismos del daño al ADN

Existen diversos reportes, en donde se demuestra la dependencia de diferentes efectos derivados del daño al ADN en función de la longitud de onda incidente. Específicamente se ha demostrado que la luz UV-B es más efectiva en la producción de cáncer de piel que la UV-A¹⁷. Sin embargo, la radiación UV-A también es mutagénica y carcinogénica¹⁸.

En el caso de las bases nitrogenadas de ADN, la radiación absorbida (\sim hasta 320 nm), produce la respuesta máxima comparada con otras λ , tanto para letalidad,

mutagenicidad y *crosslinking*, como para la ruptura del ADN. Los máximos de los espectros de acción se corresponden bastante bien con el máximo del espectro de absorción del ADN. Por consiguiente, el efecto de la radiación UV-B y UV-C se explica fácilmente teniendo en cuenta que el ADN absorbe este tipo de radiación y, consecuentemente, sufre fotólisis directa. Sin embargo, a longitudes de onda mayores a 320 nm, se produce la misma respuesta, aunque con menor eficiencia. Tanto para mutagenicidad como para ruptura del ADN se observan máximos secundarios en la región UV-A¹⁷. Teniendo claro esto se puede concluir que existen dos tipos de mecanismos por los cuales el ADN puede ser dañado. En principio, la absorción de las bases, lleva al estado excitado a la molécula, lo cual la vuelve reactiva y puede producir modificaciones o alteraciones químicas, es decir, se genera un daño directo. Este tipo de daño puede generarse por la absorción directa de radiación UV-B ó UV-C.

El otro mecanismo, puede comenzar con la absorción de la radiación incidente por parte de otro cromóforo, el cual generará especies químicas que reaccionan con el ADN, este proceso, como se mencionó anteriormente se denomina fotosensibilización y se habla de un daño indirecto. La radiación que predomina en este mecanismo es la UV-A y la visible.

Bibliografía

1. Rovira, M. ; *El sol* (2011).
2. Gasparro, F. P. ; *Sunscreen Photobiology* (1997).
3. Lakowicz, J. R. . *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; (2006).
4. Turro, N. J. . ; *Modern Molecular Photochemistry* (1991).
5. Scaiano, J. C. ; *Handbook of Organic Photochemistry* (1945).
6. Braslavsky, S. E. . ; *Pure Appl. Chem.* **79**, 293–465 (2007).
7. Wayne, C. E.; Wayne, R. P. . ; *Photochemistry* (1996).
8. Foote, S. ; *Photochem. Photobiol.* (1991).
9. Ogilby, P. R. and Foote, C. S. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3423–3430 (1983).
10. Foote, C. S.; Clennan, E. L.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F. . in *Active Oxygen in Chemistry* 105–140 (1995).
11. Martinez, L. A.; Martinez, C. G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 94–107 (2000).
12. Ravanat, J. L.; Douki, T.; Cadet, J. . ; *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **63**, 88–102 (2001).
13. Daya-Grosjean, L.; Sarasin, A. ; *Mutat. Res.* **571**, 43–56 (2005).
14. Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. . ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 13765–70 (2006).
15. Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N. . ; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298–308 (2004).
16. Wondrak, G. T.; Jacobons, M. K.; Jacobson, E. L. . ; *Photochemistry Photobiol. Sci.* **5**,

- 215–37 (2006).
17. Coohill, T. P.; Peak, M. J.; Peak, J. G. . ; *Photochem. Photobiol.* **46**, 1043–1050 (1987).
 18. Hiraku, Y.; Ito, K.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. ; *Photochem. Photobiol.* **83**, 205–212 (2007).

Capítulo 2. Propiedades químicas y bioquímicas de Pterinas

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran presentes en prácticamente todos los seres vivos, pero en muy pequeñas cantidades. Son esenciales en los mamíferos, además desempeñan funciones muy diversas, participando en reacciones bioquímicas de gran importancia. Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se llevaron a cabo a fines del siglo XIX (1889)^{1,2,3}. En estos trabajos, se reflejan los primeros intentos por aislar algunos pigmentos de diferentes clases de mariposas. Años más tarde, se dilucidó la estructura molecular de estos pigmentos, proponiéndolos como derivados del heterociclo pirazina [2,3-d] pirimidina^{4,5}, al que finalmente se lo llamó pteridina⁶.

2.1 Estructura química de las pteridinas.

Las pteridinas son tetra-azo-naftalenos conteniendo en su estructura un anillo de pirimidina y otro de pirazina (Figura 2.1). Las dos estructuras químicas de las cuales se derivan las “pteridinas naturales” presentes en los seres vivos son 2-amino-4-pteridinona, más conocida como pterina (Ptr) y 2,4-pteridindiona, llamada comúnmente lumazina (Lum) (Figura 2.1). Por lo tanto, las pteridinas que poseen un grupo amino en la posición 2 y un oxígeno en la posición 4 son denominadas pterinas y las pteridinas con un oxígeno en la posición 2 y otro en la posición 4 se las denomina lumazinas.

Debido a su estructura, las pterinas poseen diferentes formas tautoméricas (Figura 2.1). Según reportes previos el equilibrio tautomérico más importante en solución acuosa es el que se establece entre la forma lactima (tautómero 1, Figura 2.2) y la forma lactama (tautómero 2, Figura 2.2), siendo este último el más predominante^{7,8}. Debido a esto, en esta tesis se representan las pterinas mediante su tautómero más estable.

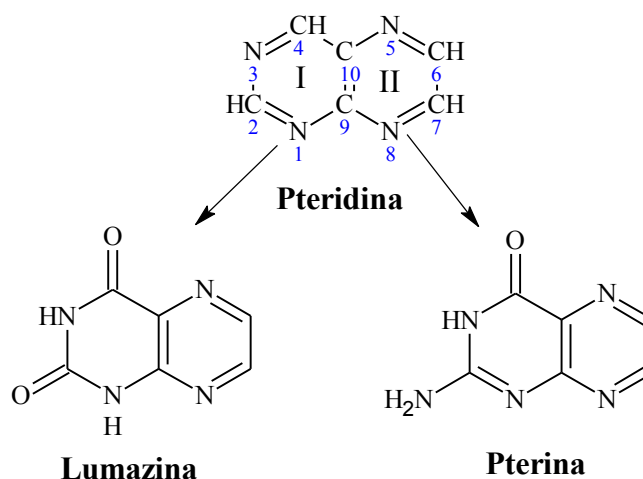


Figura 2.1. Estructura química básica de pteridinas. Anillo de pirimidina (I) y pirazina (II). Estructura química de pteridinas naturales: lumazinas y pterinas.

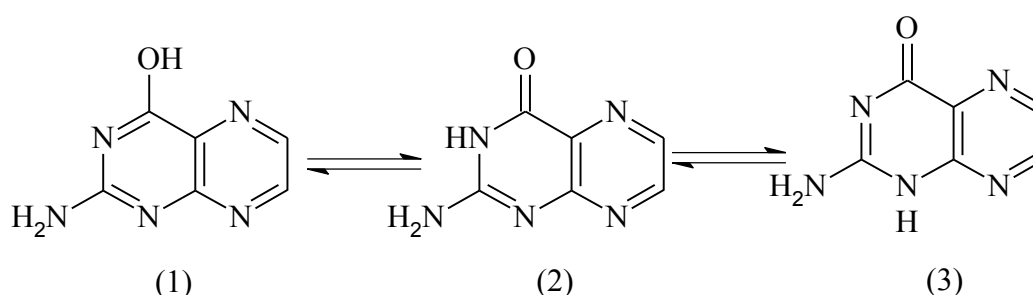


Figura 2.2. Estructuras tautoméricas de las pterinas.

Los derivados pterínicos se encuentran normalmente sustituidos en la posición 6 del anillo de pirazina. Según la estructura de este sustituyente las pterinas se pueden dividir en dos grupos:

- ✓ Pterinas **no conjugadas**: cuyos sustituyentes poseen una corta cadena hidrocarbonada o un solo átomo de carbono.
- ✓ Pterinas **conjugadas**: cuyos sustituyentes son de mayor peso molecular e incluyen una molécula de ácido paraaminobenzoico (PABA); un ejemplo es el ácido fólico (PteGlu), que además de PABA posee una o más moléculas de ácido glutámico unidas por una unión peptídica.

En la Figura 2.3, se muestran los sustituyentes correspondientes a algunos de los derivados pterínicos más estudiados y/o más importantes desde el punto de vista biológico.

Las estructuras mostradas en la Figura 2.1 y 2.2 corresponden a compuestos oxidados o aromáticos. Las pterinas pueden encontrarse también con el anillo pirazina total o parcialmente reducido. Las pterinas más comúnmente encontradas en sistemas biológicos son las 7,8- dihidropterinas y las 5,6,7,8-tetrahidropterinas.

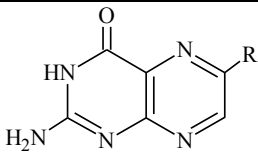
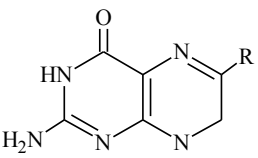
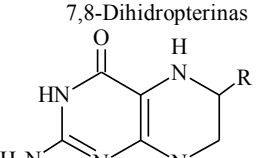
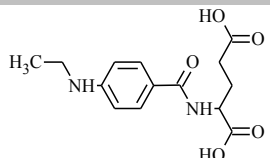
	-R	Compuesto
 <p>Pterinas Oxidadas</p>	-H	Pterina (Ptr)
	-CH ₃	6-metilpterina (Mep)
	-CHO	6-formilpterina (Fop)
 <p>7,8-Dihidropterinas</p>	-COOH	6-carboxipterina (Cap)
	-CHOH-CHOH-CH ₃	Biopterina (Bip)
	-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	Neopterina (Nep)
 <p>5,6,7,8-Tetrahidropterinas</p>	-CH ₃	6 - Metil-7,8 dihidropterina (H ₂ Mep)
		Ácido Fólico (PteGlu)

Figura 2.3. Nomenclatura y estructura molecular de algunas pterinas oxidadas y dihidroderivados.

2.2 Propiedades ácido-base de las pterinas

Las pterinas por ser compuestos heterocíclicos deficientes en electrones π , son bases extremadamente débiles⁹. Por otra parte, la presencia del fenol en la estructura le confiere también un comportamiento ácido. En la Figura 2.4 se muestra el equilibrio ácido-base más importante de las pterinas en solución acuosa, considerando los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida (amida) de este equilibrio corresponde a la forma neutra, mientras que la forma alcalina (fenolato) posee una carga negativa. Este equilibrio ya ha sido estudiado en solución acuosa, habiéndose reportado valores de pK_a alrededor de 8 para las pterinas oxidadas^{9,10,11,12,13}. Este comportamiento general está afectado por la presencia de sustituyentes adicionales en el doble anillo pterínico, los cuales modifican, en mayor ó menor medida, los valores de pK_a y la carga neta de las moléculas.

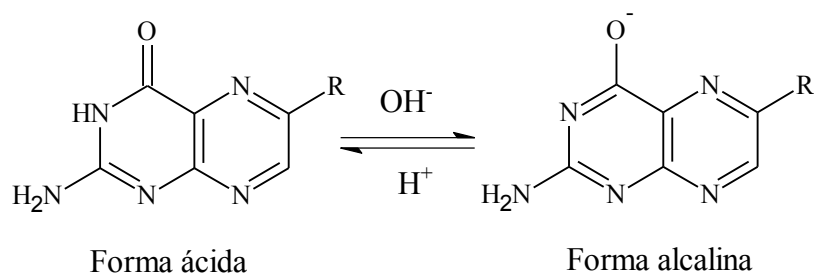


Figura 2.4 Equilibrio ácido-base de pterinas en solución acuosa de pH entre 4 y 11

Por lo general, en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 7 prevalece la forma neutra de la molécula. Por debajo de estos valores el nitrógeno anular más básico comienza a ionizarse apareciendo la primer forma catiónica. A medida que disminuye el pH, los nitrógenos comienzan a protonarse, entre los cuales puede incluirse el correspondiente al grupo 2-amino de las pterinas, entonces pueden aparecer formas catiónicas con carga +1, +2 y +3. Todos estos equilibrios presentan valores de pK_a inferiores a 4.⁹

Los experimentos presentados en este trabajo de tesis se realizaron a valores de pH cercanos a 5,5 y 10,5 en los cuales existe solo la forma amida y la forma fenolato, respectivamente (Figura 2.4). De aquí en adelante, se hará referencia a estas dos formas ácido-base denominándolas “forma ácida” y “forma alcalina”, respectivamente.

2.3 Las pterinas en la naturaleza.

Se han encontrado en sistemas biológicos numerosos derivados pterínicos. Algunos de ellos han sido extensamente estudiados y se conoce la función que desempeñan *in vivo*. Para otros, en cambio, su función aún es desconocida. A continuación se presentan algunos ejemplos de pterinas naturales.

2.3.1 Pigmentos en insectos

Algunas pterinas se encuentran en cantidades considerables como pigmentos en las alas de diversas mariposas. En particular, el pigmento amarillo aislado de las alas de una mariposa denominada *brimstone* (azufre), es xantopterina (Figura 2.5). Por otra parte,

leucopterina^{14,15} y isoxantopterina, son otros pigmentos aislados de mariposas.¹⁶ Las estructuras químicas de estos derivados se muestran en la Figura 2.5.

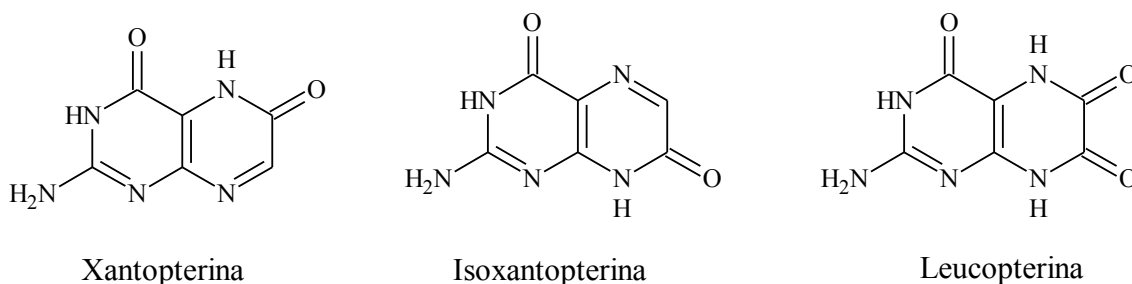


Figura 2.5 Estructura química de algunas pterinas encontradas en las alas de ciertas mariposas.

2.3.2 Pterinas como fotorreceptores

En general, se llaman fotorreceptores a sustancias que están incluidas en complejas estructuras proteicas, como grupos prostéticos necesarios para generar una señal química a partir del fenómeno primario de absorción de luz. Debido a las características espectrales de las pterinas y a su amplia distribución en órganos fotosensibles de una gran variedad de seres vivos, se ha postulado que estos compuestos podrían actuar como fotorreceptores en muchos procesos biológicos. Consecuentemente, las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las pterinas y compuestos relacionados han adquirido gran interés.

Las fotoliasas son enzimas de reparación del ADN, las cuales reparan el daño causado por la exposición a la luz ultravioleta. Este mecanismo enzimático requiere de luz visible, preferentemente de longitudes de onda entre 400 y 500 nm (colores violeta y azul) para actuar, en un proceso conocido como fotorreactivación¹⁷. El daño en el ADN causado por efecto de la luz ultravioleta, se manifiesta en la formación de dímeros de timina. Estos dímeros, forman una suerte de bulto en la estructura primaria del ADN, obstaculizando el paso de la ADN polimerasa. La enzima fotoliasa actúa separando el anillo de ciclobutano de los dímeros de timina, reconociendo los lugares defectuosos en la hebra de ADN, y abriendo los dos enlaces C-C del anillo de ciclobutano con la ayuda de dos cofactores que absorben la luz en el espectro visible mencionada anteriormente¹⁸. Por otra parte, se han encontrado algunos derivados pterínicos en órganos fotosensibles como los ojos de vertebrados e invertebrados. En particular, la pterorhodina fue aislada

en cantidades considerables de varios insectos y anfibios y parece estar ampliamente distribuida en el reino animal^{19,20,21,22}. Esta sustancia de un color rojo muy intenso consta en su estructura, de dos moléculas de xantopterina unidas por un puente de un átomo de carbono. Otro interesante grupo de pterinas naturales fue descubierto en los ojos de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta)^{23,24,25}. Se trata de las drosopterinas

2.3.3 Ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble incluida en la serie conocida como complejo vitamínico B. La biosíntesis de este compuesto se produce sólo en plantas, bacterias y hongos. El derivado activo de esta molécula es el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofólico, denominado normalmente tetrahydrofolato, el cual actúa como coenzima transportando unidades activas de un átomo de carbono. La variedad e importancia de las reacciones metabólicas en las que participa este derivado hacen que, el ácido fólico sea una molécula indispensable para la vida de los mamíferos.²⁶

El folato es esencial para la síntesis de los nucleótidos del ácido desoxirribonucleico (ADN) en células en división. Por lo tanto, su déficit afecta principalmente a células que requieren de duplicación celular constante como las células sanguíneas y de la mucosa del tubo digestivo, provocando anemia megaloblástica y síndrome de malabsorción, respectivamente. Se demostró también que el folato es esencial para el desarrollo normal del tubo neural del embrión y para la espermatogénesis.²⁷

2.3.4 Tetrahydrobiopterina

Otro derivado pterínico, que también participa en reacciones bioquímicas del metabolismo de los animales superiores, es 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (H₄Bip), que es un derivado reducido de la Bip. A diferencia del ácido fólico, este compuesto puede ser sintetizado por los seres humanos.²⁸ La H₄Bip participa en la transformación de la fenilalanina a tirosina, una importantísima reacción del metabolismo de los aminoácidos catalizada por la fenilalanina hidroxilasa. Esta enzima pertenece a la familia de las monooxigenasas, las cuales catalizan reacciones en las que participa el O₂ disuelto en el

medio. Por otro lado, la H₄Bip es cofactor de numerosas enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores. La H₄Bip juega un papel importante en diversos procesos biológicos, tales como funciones en sistemas nerviosos, respuesta inmune, proliferación celular y homeostasis vascular.

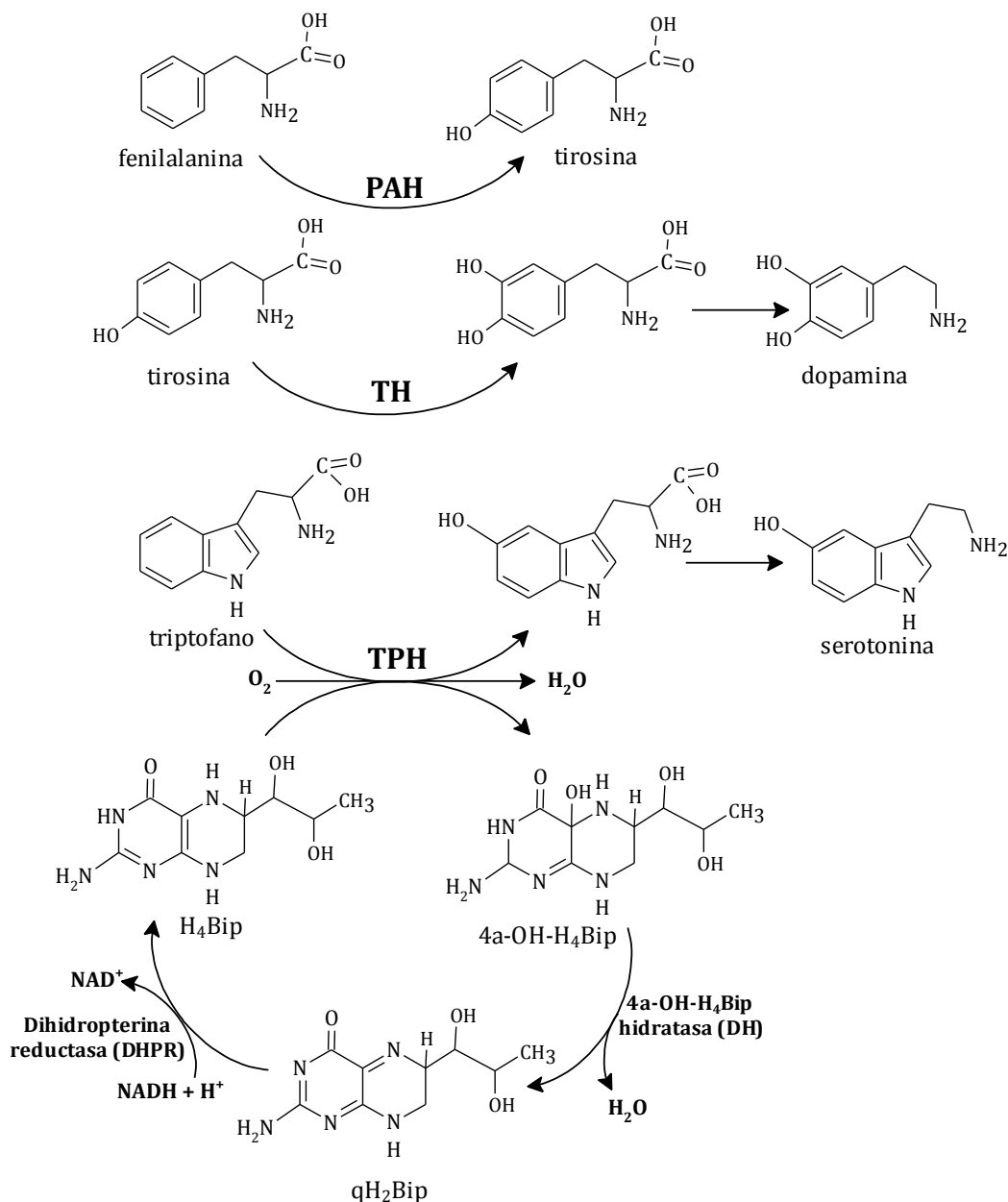


Figura 2.6 Participación de H₄Bip en las hidroxilasas.

Entre las Hidroxilasas de interés biológico que utilizan H₄Bip como cofactor está la **Fenilalanina hidroxilasa**, es una enzima que está presente en la piel la cual cataliza la conversión del aminoácido fenilalanina a tirosina (Figura 2.6). Es un paso para la

biosíntesis de la melanina (pigmento natural que sirve de protección contra la radiación UV). Una alternación de la actividad de esta enzima por déficit de H_4Bip lleva a diferentes tipos de enfermedades, por ejemplo el vitíligo.

2.4 Vitíligo

El vitíligo es una patología cutánea muy frecuente en los seres vivos humanos. Consiste en un desorden de la pigmentación que produce manchas blancas sobre la piel. Estas manchas muestran una fluorescencia característica cuando son sometidas al denominado examen con luz de Wood (351 nm). Se ha demostrado que este fenómeno ocurre por la acumulación de pterinas oxidadas en las zonas afectadas por la enfermedad^{29,30} ya que son compuestos muy fluorescentes³¹. Por este motivo resulta interesante comentar el papel que juega varios derivados pterínicos en esta patología.

Los pacientes con vitíligo presentan una síntesis exacerbada de H_4Bip , y una alteración de la ruta de reciclado de este cofactor^{32,33,34} que conduce a un aumento en la acumulación de H_4Bip y 7- H_4Bip (isómero de H_4Bip). Este último es un potente inhibidor de la primera enzima en la ruta de la síntesis de la melanina (PAH)³⁵ (Figura 2.7). Como consecuencia de la baja actividad de PAH, aumentan los niveles de fenilalanina en piel, favoreciendo la síntesis de H_4Bip y aumentando aún más los niveles del tetrahidroderivado. El incremento de los niveles de fenilalanina y 7- H_4Bip , junto a la disminución de la actividad enzimática lleva la generación y acumulación de H_2O_2 en la piel de estos pacientes^{35,36} (Figura 2.7). Esta acumulación conduce a la inactivación de la enzima catalasa³⁷, motivo por el cual en los melanocitos de los pacientes con vitíligo el medio se vuelve muy oxidante, alcanzando concentraciones de H_2O_2 del orden de milimolar. El incremento en los niveles de especies oxidantes en las manchas quedó demostrado por biopsias de piel, en las que se encuentra un alto grado de vacuolización y peroxidación lipídica.

Por otra parte, además de la inhibición de PAH (Figura 2.7) se ha demostrado que en los tejidos afectados por el vitíligo se produce inhibición de varias de las enzimas de la melanogénesis, pero, en la mayor parte de los casos, los mecanismos involucrados en dichos procesos no están dilucidados. Diferentes autores^{38,39} postulan que la H_4Bip y

H₂Bip se oxida a 6-Bip por medio de H₂O₂. Luego quedó demostrado que, H₂Bip se oxida por esta misma especie reactiva del oxígeno llevando a la generación de H₂Xap⁴⁰, demostrando que esta vía, es la responsable de la formación de pterinas oxidadas en la piel de pacientes que sufren vitíligo.

Por otra parte, la H₂Bip, además de fotodimerizar en presencia de O₂, se oxida generando su análogo aromático, Bip. Esta vía, que es despreciable en un primer momento, adquiere importancia a medida que transcurre el proceso fotoquímico. Esto se debe a que se produce una aceleración en la vía oxidativa, generada por la fotosensibilización de H₂Bip por parte de Bip y otras pterinas oxidadas, a través de un mecanismo de transferencia de electrones de H₂Bip hacia el estado triplete excitado de Bip. El mecanismo que se propone para esta reacción se presenta en la Figura 2.7, en donde se observa que, después de producirse Bip, esta misma lleva a la generación de Fop, la cual en condiciones específicas produce Cap y por último esta lleva a la generación de pterina, además en cada paso de reacción se genera H₂O₂.

En las personas que sufren esta enfermedad, la ausencia de melanina, conlleva a una falla en la protección contra la radiación UV, esta vía fotoquímica puede ser la causante de la generación de las pterinas oxidadas en la piel. Por lo tanto, este tipo de compuestos son de gran importancia para la investigación bioquímica debido a la presencia de los mismos en la enfermedad de vitíligo.

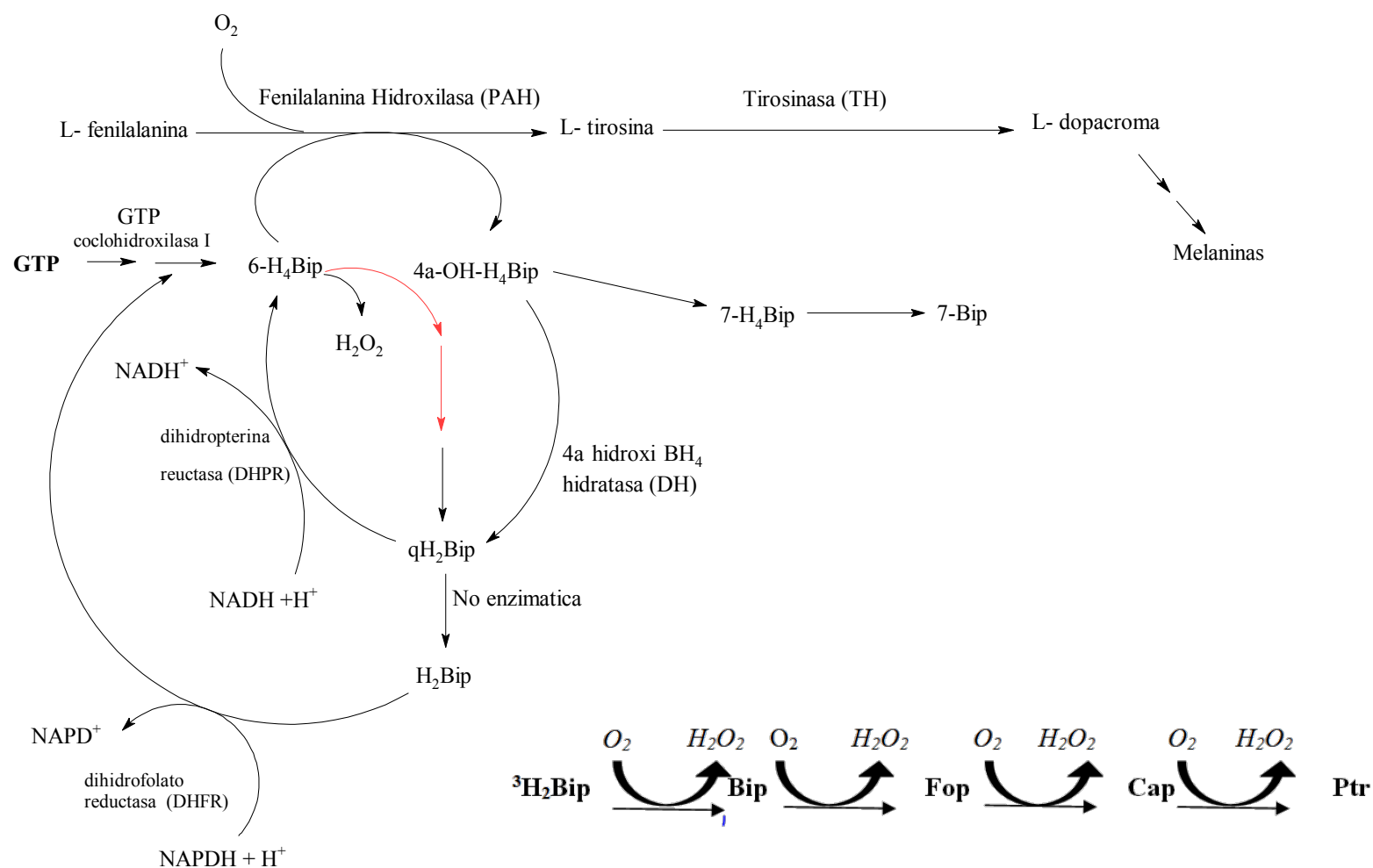


Figura 2.7. Síntesis de novo, reciclado y regulación de la síntesis de H₄Bip que tiene lugar de la melanogenesis. La línea roja (→) indica la ruta corta de reciclado de H₄Bip, favorecida en el vitiligo. Inset: Mecanismo de degradación sufrido por H₂Bip bajo irradiación UV-A.

Bibliografía

1. Hopkins, F. G. ; *Proceedings Chem. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.* **130**, 359–379 (1942).
2. Hopkins, F. G. ; *Proceedings R. Soc. London*; **5**, 117 (1889).
3. Hopkins, F. G. ; *Philos. Trans. R. Soc. London. B*; **186**, 661–682 (1895).
4. Purman, R. ; *Justus Liebigs Ann. der Chemie*; **544**, 182–190 (1940).
5. Purman, R. ; *Justus Liebigs Ann. der Chemie*; **548**, 284–292 (1941).
6. Schopf, C. ; Reichert, R. ; *Justus Liebigs Ann. der Chemie*; **548**, 82–94 (1941).
7. Brown D. J., H. E. y M. S. F. . ; *J. Chem. Soc.*; **211**, (1955).
8. Albert A. y Barlin, G. B. . ; *J. Chem. Soc.*; **3129**, (1962).
9. Albert. A.; ; *Biochem. J.*; **54**, 646–654 (1953).
10. Monóppolo, V. D.; Thomas, A. H.; Caparelli, A. . ; *Int. J. Chem. Kinet.* **32**, 231–237 (2000).
11. Thomas, A. H.; Feliz, M. R.; Caparelli, A. L. . ; *Transit. Met. Chem.* **21**, 317–321 (1996).
12. Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 167–173 (2004).
13. Thomas, A. H.; Suárez, G.; Cabrerizo, F. M.; Martino, R.; Caparelli, A. L. . ; *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **135**, 147–154 (2000).
14. Wieland H.; Schöpf, C. . ; *Ber. Deut. Chem Ges* **58**, 2178 (1925).
15. Schöpf, C.; Wieland, H. . ; *Ber. Deut. Chem Ges* **59**, 2067 (1926).
16. Wieland, H.; Metzger, H.; Schöpf, C.; Bülow, M. . ; *Liebigs Ann. Chem.*; **507**, 261 (1925).
17. Brown, T. A. in *Genomas 3a Ed* (ed. Panamericana) (2008).
18. Muller-Sterl, W. in *Bioquímica: fundamentos para medicina y ciencias de la vida* (2008).
19. Pfeleiderer, W. . ; *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*
20. Kühn, A.; Egelhaf, A. . ; *Z. Naturforsch* **14b**, 654 (1959).
21. Viscontini, M.; Hummel, W.; Fischer, A. . ; *Helv. Chim. Acta* **53**, 1207 (1970).
22. Misuraca, G.; Prota, G.; Bagnara, J. T.; Frost, S. K. . ; *Comp. Biochem. Physiol* **57B**, 41 (1977).
23. Lederer, M. . ; *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* **15**, 273 (1940).
24. Viscontini, M.; Hadron, E.; Karrer, P. . ; *Helv. Chim. Acta* **40**, 579 (1957).
25. Scwunk, I.; Manzini, M. . ; *Arch. Genet.* **46**, 41 (1973).
26. Stryer, L.; Berg, J. M.; Timoczko, J. L. ; *Bioquímica, 6ta. edición*, (2008).
27. Jablonski, N.; Chaplin, G. . ; *J. Hum. Evol* 57–106 (2000).
28. Gadiparthi, N. R. . E. C. ; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **26**, 768–770 (1985).
29. Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Pittelknow, m. R.; Gutlich, M.; Lemke, K. R.; Rodl, W.; Swanson, N. N.; Hitzemann, K.; Ziegler, I. . ; *Science (80-.)*. **263**, 1444–1446 (1994).
30. Schallreuter, K. U.; Wood, J. M.; Ziegler, I.; Lemke, K. R.; Pittelknow, M. R.; Lindsey, N. J.; Gutlich, M. . ; *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 181–192 (1994).
31. Lorente, C.; Thomas, A. . ; *Acc. Chem. Res.* **39**, 395–402 (2006).
32. Kaufman, S. . ; *J. Biol. Chem.* **245**, 4751–4759 (1970).
33. Huang, C. Y.; Max, E. E.; Kaufman, S. . ; *J. Biol. Chem.* **248**, 4235–4241 (1973).
34. Ayling, J. E.; Rebrin, I.; Thony, B.; Bailey, S. W. . ; *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates* (1997).
35. Davis, M. D.; Ribeiro, P.; Tipper, J.; Kaufman, S. . ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10109–10113 (1992).
36. Schallreuter, K. U.; Moore, J.; Wood, J. M.; Beazley, W.; Gaze, D. C.; Tobin, D. J.; Marshall, H. S.; Panske, A.; Panzig, E.; Hibberts, N. A. . ; *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **4**, 91–96 (1999).
37. Aronoff, S. ; *Science*; **150**, 72–73 (1965).
38. Rokos, H.; Beazley, W. D.; Schallreuter, K. U. . ; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **292**, 805–811 (2002).

39. Moore, J.; Wood, J.; Schallreuter, K. U. . ; *J. Raman Spectrosc.* **33**, 610–617 (2002).
40. Dantola, M. L.; Schuler, T. M.; Denofrio, M. P.; Vignoni, M.; Capparelli, A. M.; Lorente, C.; Thomas, A. H. . ; *Tetrahedron* **64**, 8692–8699 (2008).

Capítulo 3: Propiedades Espectroscópicas y Fotofísicas de las Pterinas

Desde hace muchos años, existe en literatura información sobre propiedades espectroscópicas y fotoquímicas de las pterinas. Este capítulo, presenta en forma muy breve, algunos estudios útiles para entender el comportamiento fotoquímico de los derivados pterínicos empleados en este trabajo de tesis. En particular, se describirán propiedades espectroscópicas y procesos fotoquímicos con especial énfasis en reacciones fotosensibilizadas por estos compuestos.

3.1 Espectro de absorción y fluorescencia

Las características espectrales de los derivados pterínicos dependen de varios factores, tales como el estado de oxidación del anillo pirazina, la naturaleza de los sustituyentes unidos al doble anillo pterínico y las condiciones de pH del medio. El espectro de absorción de la mayoría de las pterinas aromáticas no conjugadas presentan dos bandas de absorción^{1,2}. La banda que corresponde a la transición $S_0 \longrightarrow S_2$ de la forma ácida presenta un máximo alrededor de 280 nm, mientras que esta misma transición en la forma alcalina presenta el máximo aproximadamente en 255 nm. La banda de menor energía correspondiente a la transición $S_0 \longrightarrow S_1$ de la forma ácida presenta un máximo en el intervalo 340 – 350 nm, mientras que la forma alcalina muestra un máximo entre 350 y 360 nm. Por último, para ambas bandas, las formas alcalinas tienen coeficientes de absorción mayores que las formas ácidas. En la Figura 3.1 se presentan los espectros de absorción en fase acuosa, en su forma ácido y básico, de las pterinas oxidadas que se utilizaron en este trabajo: pterina (Ptr) y 6-metilpterina (Mep).

Por otra parte la absorción de otros compuestos pterínicos, como lo son los dihidroderivados, son muy variables y dependen de la naturaleza del sustituyente en la posición 6. En general este tipo de compuestos presentan tres bandas: una que corresponde a la transición $S_0 \longrightarrow S_3$ con un máximo de absorción a 230 nm, la segunda transición se le asigna a $S_0 \longrightarrow S_2$ con máximo entre 270-280 nm y la transición de más baja energía corresponde a $S_0 \longrightarrow S_1$ con un máximo de absorción entre 310-330 nm.

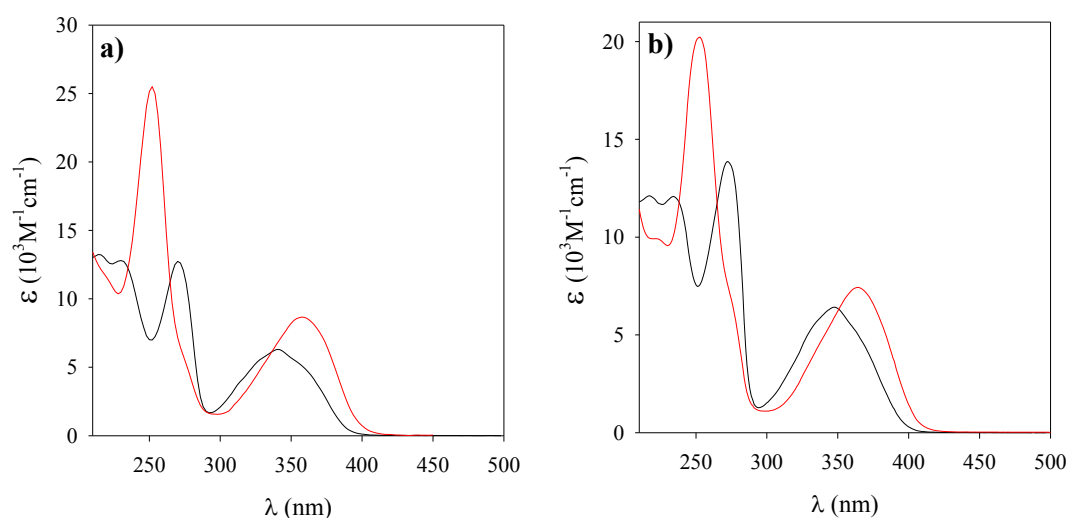


Figura 3.1 Espectros de absorción de pterinas aromáticas en solución acuosa. Forma ácida (-) y forma alcalina (-). **(a)** Ptr; **(b)** Mep.

3.2 Propiedades de los estados excitados singletes

Las propiedades de fluorescencia (espectro de emisión, excitación y tiempo de vida de fluorescencia (τ_F)) de las pterinas aromáticas dependen de varios factores^{3,1,4}. Por un lado, como ocurre con los espectros de absorción, el sustituyente en la posición 6 de este tipo de compuestos juega un papel fundamental. Mientras las pterinas conjugadas tienen una fluorescencia que es despreciable en comparación con las pterinas no conjugadas, estas últimas poseen una fluorescencia importante. Otro factor importante es el pH, es decir, su forma ácido-base afecta también la fluorescencia de estos compuestos. Específicamente, en medio alcalino, los espectros de emisión presentan un corrimiento hacia longitudes de menor energía (entre 10 y 20 nm) en comparación con la forma ácida. Por otra parte, los espectros de emisión normalizados de las pterinas no conjugadas son independientes de la longitud de onda de excitación de la pterina, lo que sugiere que la fluorescencia se da principalmente desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1).

Los valores reportados de la longitud de onda de emisión (λ_F), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y tiempo de vida de fluorescencia (τ_F), para algunas de las pterinas aromáticas se muestran en la Tabla 3.1, donde se puede observar que el Φ_F es mayor en la forma ácida que en la forma alcalina. Así mismo, los decaimientos de fluorescencia de las pterinas siguen un comportamiento exponencial de primer orden y el valor de τ_F para la forma ácida es mayor que para su correspondiente forma alcalina.

Tabla 3.1. Longitud de onda de los máximos de emisión (λ_F), rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F), tiempo de vida de fluorescencia (τ_F), rendimiento cuántico de producción de 1O_2 (Φ_Δ) y rendimiento cuántico de degradación (Φ) de las formas ácidas y alcalinas de algunas pterinas aromáticas.

Compuesto	pH	λ_F (± 5 nm)	Φ_F	τ_F (± 0.4 ns)	Φ_Δ	Φ
Ptr	5,5	439	$0,33 \pm 0,01$	7,6	$0,18 \pm 0,02$	$8,2 \times 10^{-4}$
	10,5	456	$0,27 \pm 0,01$	5,0	$0,30 \pm 0,02$	$1,2 \times 10^{-3}$
Mep	5,5	448	$0,61 \pm 0,01$	13,6	$0,10 \pm 0,02$	$2,4 \times 10^{-4}$
	10,5	460	$0,61 \pm 0,04$	13,2	$0,14 \pm 0,02$	$8,1 \times 10^{-4}$
Bip	5,5	441	$0,36 \pm 0,01$	9,1	$0,34 \pm 0,01$	
	10,5	455	$0,29 \pm 0,01$	7,6	$0,40 \pm 0,03$	
Fop	5,5	446	$0,12 \pm 0,01$	7,9	$0,45 \pm 0,05$	$4,0 \times 10^{-2}$
	10,5	454	$0,07 \pm 0,01$	2,2	$0,47 \pm 0,02$	$9,0 \times 10^{-3}$
Cap	5,5	439	$0,28 \pm 0,01$	5,8	$0,27 \pm 0,02$	$5,1 \times 10^{-3}$
	10,5	451	$0,18 \pm 0,01$	4,1	$0,37 \pm 0,02$	$1,3 \times 10^{-3}$

3.3 Propiedades de los estados excitados tripletes

Algunos trabajos realizados sobre la absorción de transientes por la técnica de LFP (*laser flash photolysis*), han reportado que cuando es excitada una solución de Ptr a 355 nm, se observa la formación, en simultáneo, de especies tripletes y radicalarias, adjudicando dos de estos transientes a los estados excitados tripletes de la Ptr⁵. El primero absorbe en un máximo de 550 nm y tiene un tiempo de vida (τ_T) de 2.3 ± 0.2 μ s. El otro transiente posee dos máximos, uno a 415 y 600 nm y un τ_T de 0.3 μ s. El hecho de tener dos estados tripletes podría deberse al equilibrio tautomérico que presentan este tipo de compuestos (Capítulo 2).

En otros trabajos, se estudió la fosforescencia de Ptr en una mezcla de agua y etilenglicol a 77K. Los resultados mostraron una banda de fosforescencia con un máximo de emisión (λ_P) centrado en 480 nm y otro que tiene menor intensidad con un máximo en 440 nm. Como se mencionó anteriormente, este efecto se le asigna generalmente a las dos especies tautoméricas, también observadas en experimentos de absorción de transientes a temperatura ambiente. A partir de los espectros de fosforescencia se determinó el valor de la energía del estado excitado triplete (37,5 kcal), valor suficiente para poder transferir energía al oxígeno en estado fundamental, y llevar a la generación de 1O_2 (Capítulo 1)

Se ha demostrado que las pterinas aromáticas, cuando son expuestas a radiación UV-A en solución acuosa, presentan un alto rendimiento cuántico de generación de 1O_2 ^{6,7,8}. Caso contrario ocurre con las pterinas conjugadas, las cuales no producen prácticamente nada de esta especie reactiva. En la Tabla 3.1, se observa que el valor de Φ_Δ se ve afectado también por el sustituyente en la posición 6, además del pH, siendo mayor en medio alcalino que en medio ácido. En el caso de los dihidroderivados, poseen una baja capacidad para generar de manera fotoquímica esta especie reactiva del oxígeno⁹.

En trabajos recientes, para estudiar la capacidad que tiene las pterinas aromáticas, para desactivar el 1O_2 se determinó el valor de la constante quenching total de 1O_2 (k_t) y la constante de reacción química de 1O_2 con pterinas (k_r)^{6,10}. Los resultados mostraron que los valores de k_r para Ptr ($0,25 \times 10^6 \pm 0,03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y Mep ($4,9 \times 10^6 \pm 0,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) son mucho más bajos que los correspondientes valores de k_t , lo que indica que la desactivación de 1O_2 por estas moléculas es principalmente un apagamiento físico. Los valores de k_r son mayores para la Mep que para la Ptr, lo que sugiere que la mayor densidad electrónica en el anillo pirazina, que es inducida por los grupos metilo favorece el ataque electrofílico del 1O_2 .

3.4 Reactividad fotoquímica de pterinas aromáticas

Cuando las soluciones aireadas de pterinas son irradiadas, estos compuestos sufren una oxidación, que conlleva a modificaciones en el sustituyente en la posición 6, mientras que sus anillos aromáticos permanecen intactos. Los mecanismos involucrados dependen de muchos factores, entre los cuales se puede mencionar el pH del medio, lo que implica que la fotoquímica de la forma ácida y básica del compuesto pterínico puede cambiar dependiendo del medio.

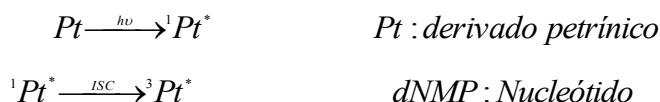
En el caso de la Ptr y Mep, no poseen un sustituyente oxidable en la posición 6. Estos compuestos son estables cuando se les irradia en solución acuosa en ausencia de O_2 . Por otra parte cuando se irradian en presencia de O_2 , se genera una oxidación del compuesto con la consecuente ruptura del anillo, y llevando a la generación de H_2O_2 ^{11,12}. Es importante aclarar que este tipo de reacciones ocurren muy lentamente en comparación con la fotodegradación de derivados pterínicos que poseen sustituyentes oxidables.

3.5 Propiedades fotosensibilizadoras de pterinas

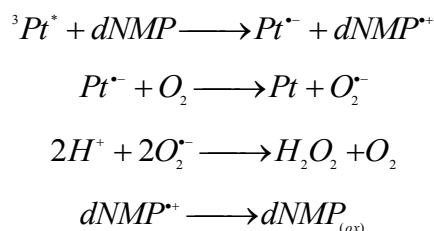
A finales de los años 90, apareció el primer trabajo que confirmó que las pterinas son capaces de fotoinducir modificaciones químicas en el ácido desoxirribonucleico (ADN)^{13,14}. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la capacidad fotosensibilizadora de la pteridinas sobre otras biomoléculas. Los antecedentes más relevantes sobre fotosensibilización de ADN se presentan en esta sección.

3.5.1 Fotosensibilización de ADN eucariota

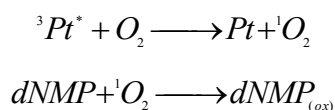
En diferentes reportes^{13,14}, se demostró que la exposición de ADN eucariota de doble hebra a radiación de 365 nm, en presencia de compuestos pterínicos tales como Ptr, Cap, Bip, Nep y Pte-Glu, conlleva a lesiones en la molécula de ADN. La eficiencia de este daño decrece en este sentido, la Ptr ~ Cap > Bip ~ Nep >> Pte-Glu. Estos estudios, demostraron que las oxidaciones y rupturas se encontraban en secuencias con varias guaninas consecutivas (secuencias poli – G: 5'GG-3', 5'GGG-3', 5'GGGG-3'). En estos estudios se postuló que el daño fotoinducido al ADN es una oxidación fotosensibilizada por mecanismos tipo I, basándose en experimentos de detección de radicales (EPR) y en irradiaciones realizadas en agua deuterada (D₂O). Se propuso que el fotosensibilizador excitado, por medio de una transferencia electrónica, oxida nucleótidos, particularmente las que contienen guanina consecutivas en los fragmentos del ADN. Esto se debe a la acumulación de dos bases guanina en un fragmento de ADN de doble cadena que genera una disminución en el potencial de ionización. Específicamente, se detectó la formación de 8-oxo-guanosina probando la existencia de la vía de hidratación del radical. Por otra parte, la formación de anión radical por parte de sensibilizador, puede regenerar el fotosensibilizador por medio de una transferencia de electrones al O₂ produciendo anión superóxido y/o se degrada.



Mecanismo tipo I



Mecanismo tipo II



3.5.2 Fotosensibilización de ADN plásmido

El plásmido pUC18 es una molécula de ADN circular de doble hebra y de bajo peso molecular. Se estudió el efecto de la radiación UV-A sobre el plásmido pUC18 usando Ptr como fotosensibilizador^{15,16}, y se demostró que, las moléculas de ADN sufren cortes al azar en su estructura, lo que conlleva a la transformación del topoisómero superenrollado al topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes conduce a la consiguiente transformación del plásmido circular en una molécula lineal. Estos reportes, demostraron que la reacción fotosensibilizada ocurre tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por lo tanto, los autores descartan la participación de las especies reactivas del oxígeno en el mecanismo de clivaje del plásmido.

Otros reportes también demostraron que bajo irradiación UV-A, utilizando como fotosensibilizador Cap, el plásmido PBR322 se corta en su cadena de ADN¹⁷. Los autores demuestran que en presencia de azida sódica (secuestrador de 1O_2) no hay reacción, lo que sugiere, en oposición al trabajo mencionado en el párrafo anterior la participación del 1O_2 en la reacción.

3.5.3 Estudios de mecanismos usando nucleótidos

Se han realizado estudios usando Ptr como fotosensibilizador y como sustratos algunos nucleótidos libres en solución acuosa, tales como 2'-desoxiguanosina 5' monofosfato

(dGMP) y 2'-desoxiadenosina 5' monofosfato (dAMP)^{15,18,19}. En el caso de la dAMP²⁰, se observó que el nucleótido es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido, a través de un mecanismo tipo I. Se demostró que la presencia de O_2 es indispensable para que la reacción ocurra y además que el 1O_2 , a pesar de ser generado en la reacción, no participa predominantemente en el mecanismo. Además en el mismo proceso se genera H_2O_2 . Por otra parte, en medio alcalino la reacción no se observó. Uno de los productos identificados de oxidación de dAMP fueron 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5' monofosfato (8-oxo-dAMP), el cual ya había sido identificado previamente como producto de oxidación a través de mecanismos tipo I, usando otro sensibilizador. Otro producto que ha sido reportado previamente es el 8-P-dAMP tetracíclico.

El otro caso es el dGMP²⁰, también es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido, en donde el nucleótido se consume en condiciones aeróbicas. La presencia de O_2 es esencial y se produce H_2O_2 y varios productos altamente polares que no se han identificado. El mecanismo principal ocurre, de manera muy similar al del dAMP, la transferencia de electrones es el proceso inicial y se confirmó la formación del radical ($dGMP(-H)^\bullet$) por los experimentos de LFP.

En medio alcalino predomina la oxidación por 1O_2 . Es decir con este nucleótido existe una mezcla de mecanismos tipo I y tipo II¹⁸, dependiendo del pH.

3.5.4 Acción Fotodinámica sobre células eucariotas

Estudios realizados con Ptr y Lum, demostraron el efecto fotodinámico de este tipo de compuestos sobre una línea cancerígena de células eucariotas a pH fisiológico (células *HeLa*)^{21,22}. El fotosensibilizador puede llegar a localizarse dentro de los dominios intracelulares, asociándose con las mismas membranas. Se mostraron todos los controles y se comprobó que en oscuridad no se genera ninguna reacción, en caso de irradiación UV-A se observó pérdida de la estructura de las células incubadas con Ptr ó Lum, relacionándose con una falla mitocondrial y con la alteración misma de las membranas. En otros estudios se demostró que la Cap es adecuada para la prevención del crecimiento de *S. aureus*, ya sea como "células libres" (planctónicos) o como adherentes (sésiles). La eficacia de la Cap en matar las células planctónicas facilita la prevención de la formación de biofilm²³.

Bibliografía

1. Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Thomas, A. H.; Caparelli, A. L. . ; *Photochem. Photobiol.* **81**, 793 – 801 (2005).
2. Thomas, A. H.; Suárez, G.; cabrerizo, F. M.; Garcia Einschlag, F.S.; Martino, R. Baiocchi, C.; Pramauro, E.; Caparelli, A. L. . ; *Helv. Chim. Acta* **85**, 2300–2315 (2002).
3. Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Pokhrel, M. R.; Oliveros, E.; Thomas, A. H.; Braun, A. M. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 421–426 (2002).
4. Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 167–173 (2004).
5. Chahidi, C.; Aubailly, M.; Momzikoff, A.; Bazin, M.; Santus, R. . ; *Photochem. Photobiol.* **33**, 641–649 (1981).
6. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Capparelli,; Martinez, G.; Braun, A. M. and O. E. . ; *Photochem. Photobiol. Sci* **2**, 245–250 (2003).
7. Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H. . ; *Helv. Chim. Acta* **87**, 349–365 (2004).
8. Cabrerizo, R.; Vignoni, M.; Erra-Balsells, R.; Franco, M.; Caparelli, A. L.; Thomas, A. H. . ; *Helv. Chim. Acta* **89**, 1090–1104 (2006).
9. Dántola, M. L. . Ph. D. Tesis; La Plata. (2008).
10. Petroselli, G. *et al.* ; *Org. Biomol. Chem.* **2**, 526–534 (2007).
11. Cabrerizo, F. M.; Dantola, M. L.; Thomas, A. H.; Lorente, C.; Braun, A. M.; ; Oliveros, E.; Capparelli, A. L. . ; *Chem. Biodivers* **1**, 1800–1811 (2004).
12. Suárez, G.; Cabrerizo, F. M. F.; Lorente, C.; Thomas, A. H.; Capparelli, A. L. . ; *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **132**, 53–57 (2000).
13. Ito, K.; Kawanishi, S. ; *Biochemistry*; **36**, 1774–1781 (1997).
14. Hiramoto, K.; Suzuki, H.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. . ; *Arch. Biochem. Biophys.* **410**, 261–268 (2003).
15. Lorente, C. . Ph.D. Tesis; La Plata; (2003).
16. Lorente, C.; Thomas, A. H.; Villata, L. S.; Hozbor, D.; Lagares, A.; Capparelli, A. L. . ; *Pteridines* **11**, 100–105 (2000).
17. Offer, T.; Ames, B.; Bailey, S. W.; Sabens, E. A.; Nozawa, M.; Ayling, J. E. ; *FASEB J.* **21**, 2101–2107 (2007).
18. Petroselli, G.; Dantola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; and Thomas, A. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3001–3011 (2008).
19. Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. . ; *Org. Biomol. Chem* **5**, 2792–2799 (2007).
20. Serrano, M. P. . Ph.D. Tesis; La Plata; (2014).
21. Denofrio, M.; Hatz, S. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 1539–1549 (2009).
22. Denofrio, M. P.; Lorente, C.; Breitenbach, T.; Hatz, S.; Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H.; Ogilby, P. R. . ; *Photochem. Photobiol.* **84**, 862 – 866 (2011).
23. Miñán, A. G. *et al.* ; *Biofouling* **31**, 459–468 (2015).

Capítulo 4: Aminoácidos, péptidos y proteínas.

Las proteínas son macromoléculas constituidas a partir de aminoácidos que desempeñan diversas funciones. Desde el punto de vista de su composición elemental están formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Son polímeros lineales contruidos a partir de monómeros, llamados aminoácidos, enlazados uno tras otro. El enlace amida, se forma entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, recibiendo el nombre de enlace peptídico (-CO-NH-). Los polímeros de aminoácidos se diferencian según sus pesos moleculares o con el número de residuos que contienen. Las moléculas con pesos moleculares que van desde varios miles hasta varios millones de daltones (D) y que tienen más de 50 aminoácidos, se denominan proteínas. Aquellas con pesos moleculares bajos, que constan de menos de 50 aminoácidos, se denominan péptidos.

En las proteínas se encuentran habitualmente 20 tipos de cadenas laterales que varían según el tamaño, forma, carga, capacidad de formar puentes de hidrógeno, carácter hidrofóbico y reactividad química. El criterio más utilizado para clasificar los α -aminoácidos de las proteínas es por su estructura tridimensional, la que se basa en la naturaleza polar o no polar, con o sin carga eléctrica de las cadenas laterales o grupo R. En este capítulo se pretende revisar las estructuras y propiedades químicas tanto de aminoácidos como de péptidos. Además, se describirán las características estructurales y funcionales de algunos péptidos con actividad biológica, teniendo en cuenta la relación y la función de la cadena peptídica.

4.1 Aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que poseen un grupo carboxilo y un grupo amino. Pueden ser α , β , γ , δ ...**aminoácidos**, según el grupo amino esté unido respectivamente al primero, segundo, tercero, cuarto... átomo de carbono contando a partir del átomo de carbono del grupo carboxilo. En la naturaleza existen distintos tipos de aminoácidos que desempeñan diferentes funciones, sin embargo, los aminoácidos que forman parte de las proteínas son todos ellos **α -aminoácidos** (Figura 4.1).

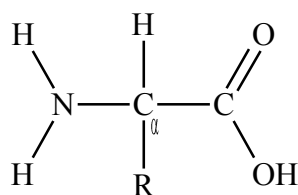


Figura 4.1. Estructura básica de los aminoácidos.

4.1.1 Comportamiento ácido-base

Los aminoácidos presentan un punto de fusión y una solubilidad en agua muy superior a lo que se esperaría dado su peso molecular. Ello se debe a que los aminoácidos existen en solución, y cristalizan a partir de las disoluciones, en forma de iones dipolares. A pH neutro existen predominantemente como iones dipolares, (también llamados *zwitteriones*), con el grupo amino protonado ($-NH_3^+$) y el grupo carboxilo desprotonado ($-COO^-$). Así, los aminoácidos pueden comportarse como ácidos o como bases según el pH del medio, debido a esto se considera como sustancias anfóteras. (Figura 4.2). Por otra parte, algunos aminoácidos presentan cadenas laterales con grupos funcionales (R) que son potencialmente dadores o aceptores de protones, y por lo tanto también influye de manera determinante en sus características ácido-base. Este comportamiento tiene una gran importancia biológica, ya que influye a su vez en las propiedades de las proteínas de las cuales forman parte.

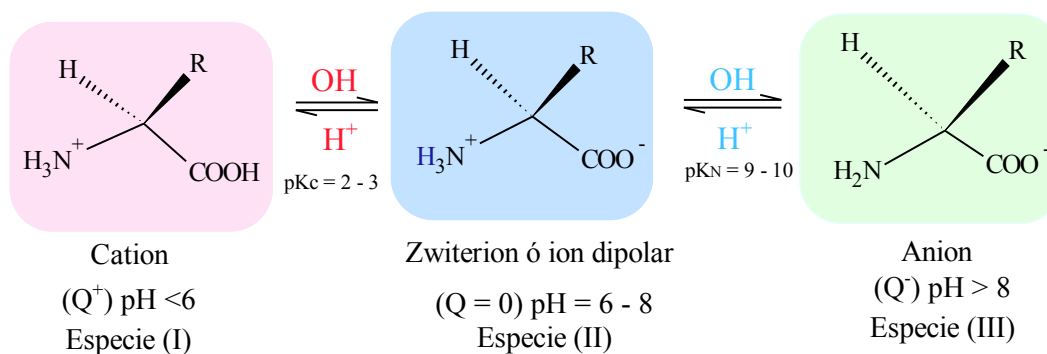
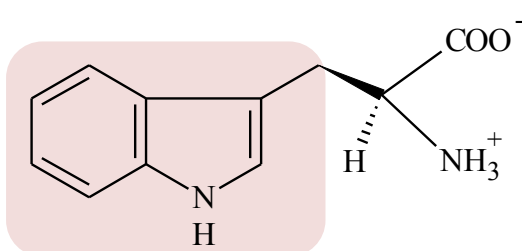


Figura 4.2. Estado de ionización como función de pH de aminoácidos

4.1.2 Aminoácidos estudiados

En este trabajo se evaluó el efecto fotosensibilizador de compuestos pterínicos sobre aminoácidos. Para esto, se eligió un grupo de estos compuestos que previamente han sido reportados como sustratos fácilmente oxidables. En esta sección se presentan algunas propiedades físicas, características ácido-base, espectros de absorción y emisión del grupo de aminoácidos estudiados.

Triptofano (Trp)



El triptófano es un aminoácido neutro presente en los organismos vivos. Es uno de los 20 aminoácidos que se incorporan en las proteínas durante el proceso de traducción del RNA. Además, es un precursor de la

serotonina, un neurotransmisor de la vitamina niacina (también conocida como ácido nicotínico o vitamina B3)¹. En el triptófano, sólo el estereoisómero L interviene en la síntesis de proteínas de mamíferos, sin embargo, el estereoisómero D, se encuentra ocasionalmente en la naturaleza. Todos los residuos de triptófano en las secuencias de proteínas y péptidos se indican convencionalmente con el código de tres letras Trp o con el de una letra W. Es un aminoácido hidrofóbico y aromático, puesto que posee un anillo con dobles enlaces resonantes conjugados, que le otorga a la molécula una gran estabilidad estructural. La fórmula química de este aminoácido es $C_{11}H_{12}N_2O_2$ con un peso molecular de 204,2 g/mol, además posee dos pK con valores de 2,38 y 9,34.

El Trp tiene características espectrales particulares, con una longitud de absorción máxima aproximadamente a 280 nm y una longitud de emisión máxima alrededor de 355 nm (Figura 4.3). Excitando a 295 nm, el espectro de emisión del triptófano es dominante sobre la fluorescencia más débil de la tirosina y fenilalanina. Esta emisión depende en gran proporción del ambiente en que se encuentre este residuo². La fluorescencia es una técnica importante que puede ser usada para estimar la naturaleza del microambiente del triptófano, por lo tanto, puede ser utilizada como medida del estado conformacional de una proteína. Por lo tanto, la fluorescencia del Trp es una medida sensible del estado conformacional de los residuos individuales del Trp^{3,4,5}.

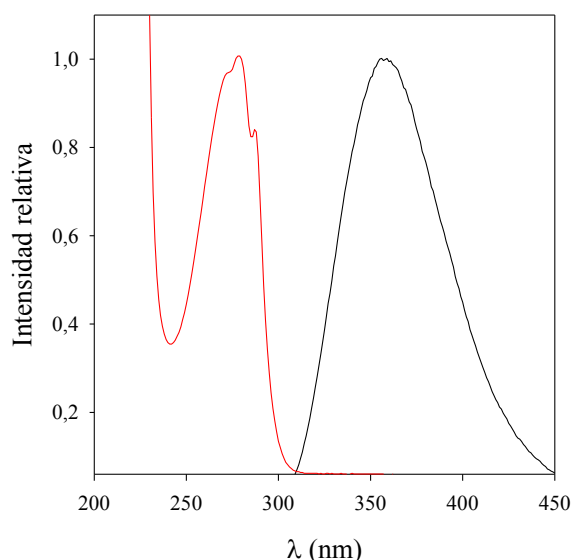
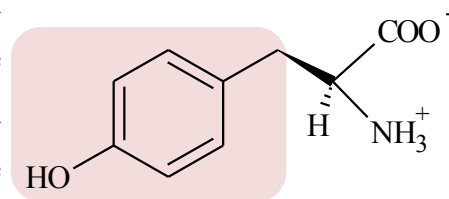


Figura 4.3 Espectros de absorción y emisión de Trp

Tirosina (Tyr)

La tirosina es un aminoácido que se encuentra en la mayoría de las proteínas. Normalmente se convierten desde el aminoácido esencial fenilalanina en el cuerpo humano, y es un precursor de compuestos químicos importantes como la epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina), la dopamina, hormonas tiroideas, y la melanina. En los seres humanos, el isómero L- tirosina es la única forma que está implicada en la síntesis de proteínas. La tirosina es nombrada como Tyr o Y y su fórmula química es $C_9H_{11}NO_3$, con un peso molecular de 181,19 g/ mol, y tiene valores de pK de 2,24, 9,09 y 10,10. La Tyr posee un espectro de absorción centrado aproximadamente en 275 nm y, al igual que el Trp, tiene características espectrales particulares con una emisión en 305 nm (Figura 4.4). Es importante mencionar que las propiedades fluorescentes, son esenciales al realizar los análisis de estos aminoácidos en proteínas y péptidos, ya que la emisión de ambos (Trp y Tyr) están en longitudes de onda diferente, por lo tanto, le confieren una característica fundamental para la detección y cuantificación de ambos aminoácidos por separado^{6,7,8}.



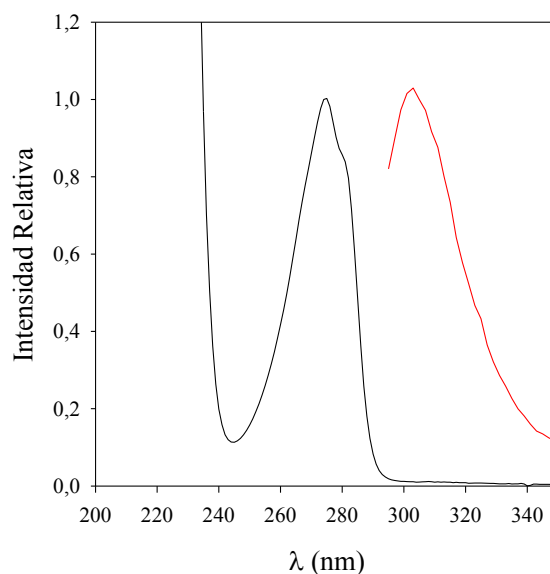
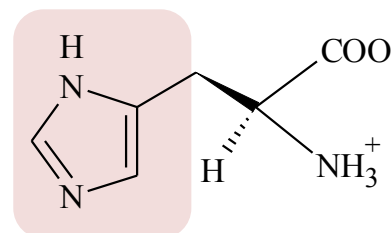


Figura 4.4 Espectros de absorción y emisión de Tyr

Histidina (His)

La His es un aminoácido común en muchas proteínas. Es el precursor de la histamina e importante en la síntesis de purinas. Como la arginina y la lisina, la histidina se clasifica como un aminoácido básico. Sin embargo, la cadena lateral de His le permite actuar como una base y un ácido, tanto para la donación y aceptación de protones, que puede ser de considerable importancia en su papel como parte de las proteínas.



La histidina se representa como His o H, su nombre sistemático es 2-amino-3- (1H-imidazol-4-il)-propanoico, su grupo funcional es un anillo imidazol cargado positivamente. La fórmula química de este aminoácido es $C_6H_9N_3O_2$, con un peso molecular de 155,16 g/ mol y con valores de pK de 1,7 , 6,04 y 9,09. Este aminoácido tiene un pK de 6,04, lo que indica que pequeños cambios en el valor del pH fisiológico, provocan modificaciones en la carga total. Por debajo de este valor el anillo imidazol está mayoritariamente protonado con carga positiva, es decir, a un pH de ~ 6 , su grupo lateral imidazol sólo está cargado en un 50% lo que hace que la His sea neutra en un extremo básico del espectro a pH fisiológico. De los veinte α -aminoácidos, únicamente la histidina (con un $pK = 6$) ioniza dentro de la escala de pH fisiológicos, este hecho tiene como consecuencia que las cadenas laterales de la His participen en las reacciones catalíticas de las enzimas^{9 10}.

En la Figura 4.5, se presentan los espectros de absorción de la His en dos condiciones de pH diferentes, la cual posee una absorción alrededor de 211 nm. Los espectros de absorción en condiciones ácidas tienen un coeficiente de absorción mayor en comparación con el espectro a pH alcalino.

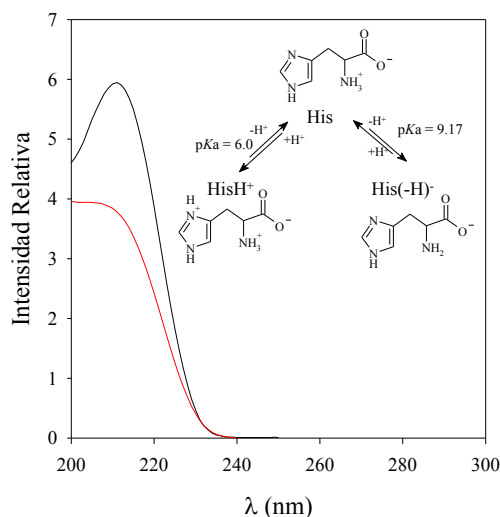
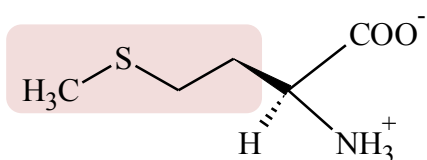


Figura 4.5 Espectros de absorción de His en dos condiciones de pH. Formas ácido-base en el rango de pH 5-11.

Metionina (Met)



La metionina es un aminoácido presente en muchas proteínas y, junto con la cisteína (Cys), es uno de los dos aminoácidos que contienen azufre¹¹. La metionina puede ser abreviada como Met o M, y su nombre sistemático es 2-amino-4- (metiltio) butanoico, es un aminoácido hidrofóbico. La fórmula molecular de la Met es $C_5H_{11}NO_2S$ y tiene un peso molecular de 149,2 gr/ mol. Como la cisteína, la Met contiene azufre, pero con un grupo metilo en lugar de hidrógeno, este grupo metilo puede ser activado, y se utiliza en muchas reacciones en las que se añade un nuevo átomo de carbono a otra molécula¹². La Met posee una absorción por debajo de 240 nm, con un máximo centrado en 211 nm (Figura 4.6).

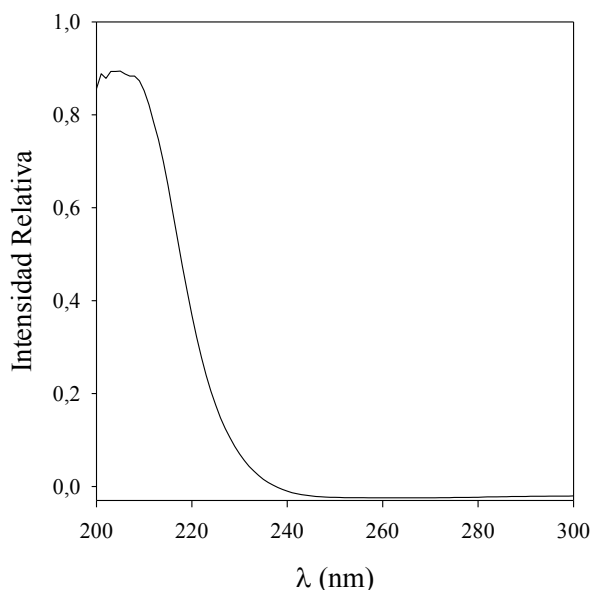


Figura 4.6 Espectros de absorción de Met.

4.2 Enlace peptídico. Los péptidos

Los grupos funcionales de las moléculas orgánicas determinan las reacciones que pueden experimentar. Los aminoácidos con sus grupos carboxilo, amino y varios grupos R pueden experimentar numerosas reacciones químicas. Sin embargo, la formación de enlaces peptídicos y de puentes disulfuro es de especial interés debido a su efecto sobre la estructura proteica.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas son formadas por la unión del grupo α -carboxilo de un aminoácido al grupo α -amino de otro aminoácido. Este tipo de unión se llama enlace peptídico (o también enlace amida) y se forman cuando el par de electrones sin compartir del átomo de nitrógeno de un aminoácido ataca al carbono del carboxilo de otro, en una reacción de sustitución de acilo nucleofílica y se acompaña por la pérdida de una molécula de agua (Figura 4.7).

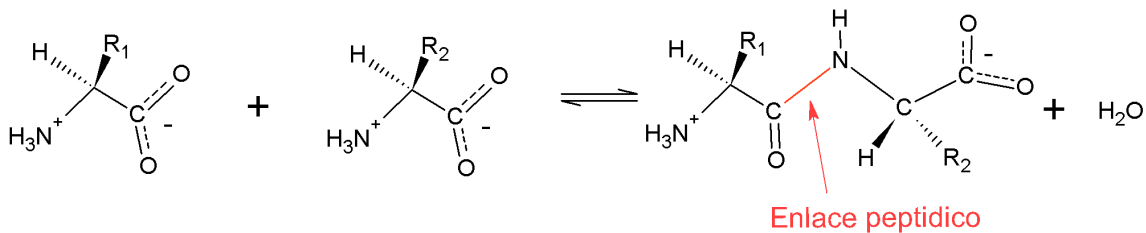


Figura 4.7 Formación del enlace peptídico. La unión de dos aminoácidos se acompaña de la pérdida de una molécula de agua

El equilibrio de esta reacción está más desplazado hacia la hidrólisis que hacia la síntesis. Por ello, la biosíntesis de los enlaces peptídicos requieren un aporte de energía libre. No obstante, los enlaces peptídicos son *estables cinéticamente*. Una cadena polipeptídica consta de una parte repetida regularmente, llamada cadena principal, y una parte variable constituida por las cadenas laterales características. La cadena principal es potencialmente rica en capacidad para formar puentes de hidrógeno. Cada residuo contiene un grupo carbonilo, el cual es buen aceptor de puentes de hidrógeno y una amina secundaria capaz de ceder átomos de hidrógenos. Dado que todos los enlaces que conectan a los residuos de aminoácidos constan de enlaces sencillos, puede esperarse que cada péptido experimente cambios de conformación constante producidos por la rotación alrededor de los enlaces sencillos.

4.3 Péptidos con Actividad biológica. Hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH)

En la naturaleza existen numerosos ejemplos de péptidos con actividad biológica. En este trabajo de tesis se estudiará el efecto de procesos fotosensibilizados por pterinas sobre péptidos. Para ello se eligió como sustrato de estudio a la hormona α -MSH, debido que es un compuesto presente en la piel y por ende, puede ser expuesto naturalmente a radiación UV-A en presencia de pterinas. Esta hormona, es particularmente interesante porque como se explica a continuación, regula la pigmentación de la piel, y en consecuencia su degradación puede conducir a una pérdida de la protección natural de la piel contra la radiación.

4.3.1 Biosíntesis de MSH

La hormona estimulante de melanocitos (MSH), también llamado melanotropina, es uno de los diversos péptidos derivados de una proteína conocida como proopiomelanocortina (POMC) y secretada principalmente por la glándula pituitaria. En la naturaleza, la MSH es secretada específicamente por el lóbulo intermedio de la glándula pituitaria y funcionan principalmente en el oscurecimiento de la piel, con una serie de otras actividades, de menor importancia. Los péptidos MSH incluyen α -MSH, β -MSH, y γ -MSH. Ellos se distinguen entre sí por su unión a diferentes receptores de

melanocortina (MCR), a través del cual ejercen sus efectos, y además por su estructura, ya que se derivan de una región diferente de la POMC. El péptido α -MSH, por ejemplo, se deriva de la región media de la POMC, mientras que β -MSH se deriva del C-terminal (el extremo que contiene un grupo carboxilo) y γ -MSH desde el N-terminal (el extremo que contenga un grupo amina) (Figura 4.8). Tras la secreción de la pituitaria, MSH circula en la sangre y se une a MCRs en la superficie de células que contienen pigmento llamadas melanocitos (en seres humanos) y cromatóforos (en vertebrados inferiores). La activación subsiguiente de MCRs provoca un aumento de las concentraciones de pigmentos de melanina y altera la distribución de melanina en las células. En los seres humanos, este proceso se manifiesta como oscurecimiento de la piel, con la exposición a la luz solar que actúa como estímulo para la producción y secreción de MSH¹³.

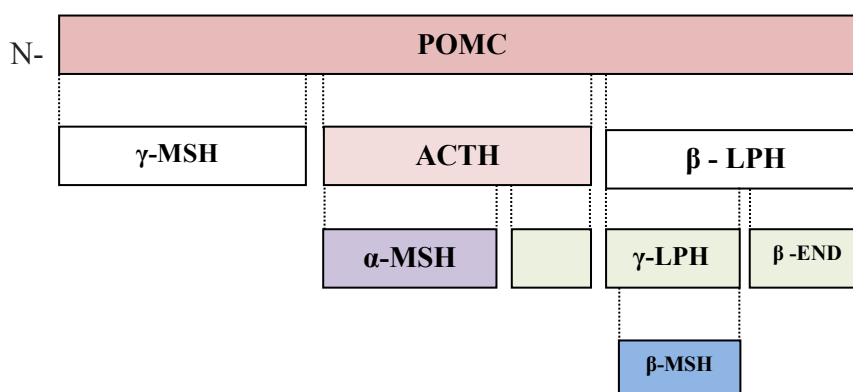


Figura 4.8. Biosíntesis del péptido POMC y generación de las hormonas tales como ACTH, α - , β - , γ -MSH y β - Endorfina (β - END). UP: péptido de unión; NT: N- Terminal;

4.3.1.2 Estructura y función de la α -MSH

La α -MSH, contiene 13 aminoácidos con la siguiente secuencia Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂ (Figura 4.9), su fórmula molecular es C₇₇H₁₀₄N₂₁O₁₉S y tiene un peso molecular de 1664,9 gr/ mol. La α -MSH actúa sobre los melanocitos o las células cromóforas distribuidos en su mayoría en la dermis y epidermis de la piel. Estas células tienen enzimas que sintetizan a la melanina desde el aminoácido tirosina. El pigmento es almacenado en forma de gránulos en las áreas adyacentes a la membrana nuclear. Estudios farmacológicos, usando bioensayos de la pigmentación de la piel de rana dieron como resultado que la actividad biológica de la α -MSH está altamente influenciada por esta secuencia mínima, lo que lleva a concluir que es indispensable para los efectos melanotrópicos¹⁴. Por otra parte, también se

demostró que el C- y N-terminal de la α -MSH no tienen ningún efecto en este tipo de ensayos en la piel de rana y lagartos¹⁵.

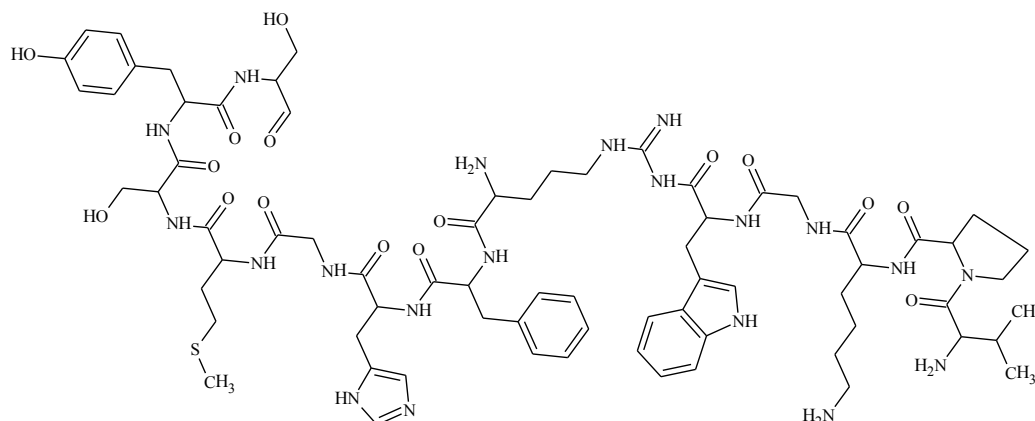


Figura 4.9 Estructura molecular de α -MSH.

4.4 Proteínas

La similitud que todas las proteínas poseen, es una misma estructura química central, la cual consiste en una cadena lineal de aminoácidos. La diferencia entre una proteína y otra es la secuencia de aminoácidos por la cual está compuesta, lo que se le conoce como estructura primaria de una proteína. La estructura primaria de una proteína es determinante en la función que cumplirá después, así las proteínas estructurales poseen mayor cantidad de aminoácidos rígidos y que establezcan enlaces químicos fuertes para dar dureza a la estructura que forman.

Por otra parte, la secuencia de los aminoácidos puede generar múltiples conformaciones en el espacio que se forman con el plegamiento de la proteína. Este plegamiento se puede producir de forma espontánea, debido a la repulsión de la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, la atracción entre aminoácidos y/o formación de puentes disulfuro. Por lo tanto, la estructura primaria se da por la secuencia de los aminoácidos en la cadena, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados y la forma en que se pliega la cadena se analiza en términos de estructura secundaria. Además las proteínas adoptan distintas posiciones en el espacio, por lo que se describe una tercera estructura. La estructura terciaria, por tanto, es el modo en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio, es decir, cómo se enrolla una determinada proteína. Así mismo, las proteínas no se componen, en su mayoría, de una única cadena de aminoácidos, sino que se suelen agrupar varias cadenas polipeptídicas (o

monómeros) para formar proteínas multiméricas mayores. A esto se llama estructura cuaternaria de las proteínas, a la agrupación de varias cadenas de aminoácidos (o polipéptidos) en complejos macromoleculares mayores.

Bibliografía

1. Pallaghy, P. K.; Melnikova, A. P.; Jimenez, E. C.; Olivea, B. M.; Norton, R. S. ; *Biochemistry* **35**, 11553–11559 (1999).
2. Brooks, D. W. *Brook teaching and research website*. (2007).
3. Bleisler, J. H. *Rutgers Law Journal Retrieved*. (2000).
4. Retrieved, F. *Food and Drug Administration*. (2001).
5. Retrieved, F. *Food and Drug Administration*. (2007).
6. Chinevere, T. D.; Sawyer, R. D.; Creer, A. R.; Conlee, R. K.; and Parcell, A. C. ; *J. Appl. Physiol.* **93**, 1590–1597 (2002).
7. Folling, A. ; *Ztschr. Physiol. Chem.*; **227**, (1934).
8. Hoffhines, A. J.; Damoc, E.; Bridges, K. G.; Leary, J. A.; Moore, K. L. ; *J. Biol. Chem.* **281**, 37877–37889 (2006).
9. Doolittle, R. F. in *New York: Plenum Press* (1989).
10. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L. . C. M. in *New York: Worth Publishing* (2000).
11. Longe, J. L. *The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine*. (20058).
12. Barger, G.; Weichselbaum, T. E. ; *Org. Syntheses* **384**, (2007).
13. Pattison, D. I.; Rahmantoa, A. S.; Davis, M. J. ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 38–53 (2012).
14. Neverov, K. V.; Mironov, E. A.; Lyudnikova, T. A.; Krasnovsky, A. A.; Kritsky, M. S. . ; *Biochemistry* **61**, 1149–1155 (1996).
15. Egorov, S. Y.; Krasnovsky, A. A.; Bashtanov, M. Y.; Miranov, E. A.; Ludnikova, T. A.; Kritsky, M. S. ; *Biochemistry* **64**, 1117–1121 (1999).

Capítulo 5: Fotosensibilización de Proteínas y Aminoácidos

Muchas de las formas vivas en la superficie terrestre son expuestas a radiación diariamente; La atmósfera de la tierra absorbe radiación por debajo de 295 nm, es decir, toda la banda de UVC (λ 200-280 nm) y parte de la UVB (λ 280-320 nm). La mayor parte de exposición a la superficie de la tierra corresponde a radiación UVA (λ 320-400 nm), radiación visible (Vis, 400 – 700 nm) e infrarrojo (IR, 700 – 5000 nm) (Figura 5.1)¹. La interacción de la radiación electromagnética proveniente del sol puede provocar en los seres vivos efectos beneficiosos, como la fotosíntesis y la síntesis de la vitamina D, o perjudiciales, como el cáncer de piel y las fotoalergias.

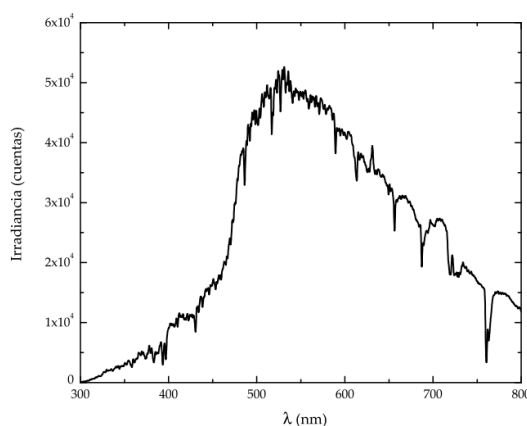


Figura 5.1 Irradiancia solar espectral en función de la longitud de onda. Medida para la ciudad de La Plata, con cielo despejado.

El daño provocado por la radiación sobre proteínas y sus componentes puede ocurrir por dos mecanismos. El primero es mediado predominantemente por la absorción de radiación de diferentes residuos de aminoácidos (triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), metionina (Met) entre otras), lo que lleva a la formación de estados electrónicamente excitados, los cuales conducen a cambios químicos por reacciones de foto-ionización. Debido a que la radiación absorbida por los aminoácidos en la superficie de la tierra es prácticamente nada, la probabilidad que ocurra la absorción directa de luz, es baja. El otro mecanismo consiste en los procesos fotosensibilizados descritos en el Capítulo 1. En este caso los fotosensibilizadores actúan por lo general con una mezcla de tipo I (transferencia de electrones, abstracción de H) y/o tipo II (transferencia de energía, 1O_2)^{2,3,4}.

5.1 Reacciones de fotosensibilización de aminoácidos

Los reportes mostrados en esta sección, se enfocan específicamente en trabajos previos de procesos fotosensibilizados de aminoácidos, específicamente los estudiados en esta tesis, centrando especial atención en los mecanismos de reacción propuestos y en los fotoproductos generados.

Una de las vías de oxidación de los aminoácidos, péptidos y proteínas ocurre a través de las reacciones de 1O_2 con las cadenas laterales de Trp, Tyr, His, Met y Cys. En estos casos el 1O_2 reacciona con las cadenas de las proteínas más rápidamente que con otras moléculas^{5,3,6}. Además, las proteínas están también presentes en la mayoría de los sistemas biológicos a concentraciones mucho más altas que otras moléculas potenciales para 1O_2 . Es importante aclarar que en la mayoría de trabajos de fotosensibilización, se reporta que las reacciones de los aminoácidos se dan principalmente con 1O_2 como intermediario.

5.1.1 Reacciones con residuos de triptófano (Trp)

La oxidación de Trp por 1O_2 , resulta en la formación ya sea de un intermediario dioxetano a través del doble enlace C2-C3 del Trp, o un hidroperóxido en la posición C3⁷ (Figura 5.2). Estos intermediarios pueden luego descomponerse a N-formilquinurenina (NFK) (por lo tanto quinurenina (Kyn) vía hidrólisis) por medio del cierre del anillo (3 α -dihidroxipirrolindol⁸) que envuelve el grupo amino del aminoácido libre. Este producto tendría menor probabilidad de formarse en péptidos y proteínas, debido al enlace peptídico. Sin embargo, existen reportes en los que se demuestra que los derivados de 3 α -dihidroxipirrolindol se forman en péptidos y en algunas proteínas^{9,10,11}. La NFK y Kyn son compuestos que pueden actuar como agentes fotosensibilizantes, incluso más efectivos que el propio aminoácido¹² y además, producen una cantidad de especies reactivas que pueden degradar aún más estos y otros compuestos. La NFK y Kyn tienen absorción a 325nm y 360 nm respectivamente. Ambos compuestos tienen una emisión característica, en el caso de la NFK emite a 435 nm y para la Kyn en 460 nm¹³. Estas características espectroscópicas son útiles para identificar el ambiente del aminoácido en péptidos o proteínas¹⁴.

Por otra parte, Se ha demostrado que un gran número de productos de oxidación de Trp libre, reacciona con las proteínas, lo que puede resultar en la formación de aductos covalentes de los enlaces con residuos de Cys, His y Lys^{15,16}.

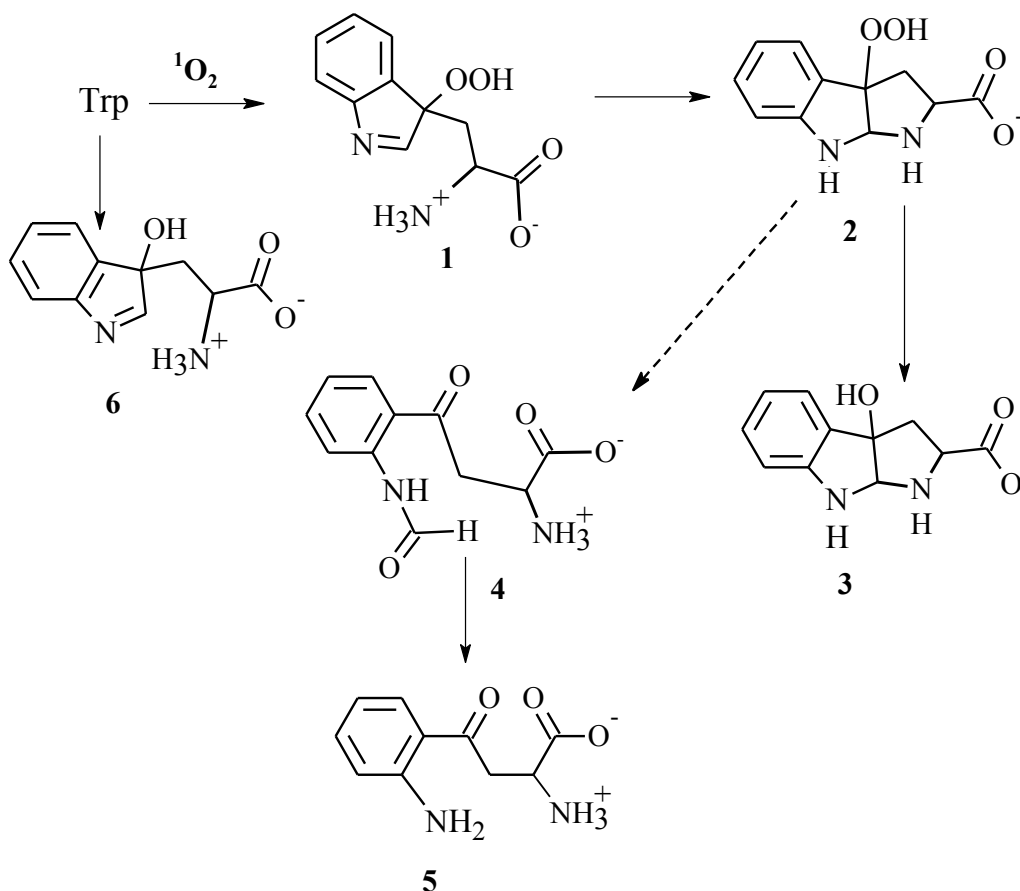


Figura 5.2 Mecanismo de oxidación de Trp por absorción UV directa y mediante 1O_2 . Estructuras de los productos de oxidación: **1.** C3 hidroxiperoxido; **2.** 3α hidroperoxipirroindol; **3.** 3α hidroperoxipirroindol; **4.** N-Formilquinurenina; **5.** Quinurenina; **6.** C3 alcohol.

5.1.2 Reacciones con residuos de tirosina (Tyr)

La reacción con residuos de Tyr libre por 1O_2 , inicia con la generación de endoperoxidos inestables (Figura 5.3). Éste rápidamente se descompone por la apertura del anillo para dar un hidroperóxido, y productos ciclados que implica la adición nucleofílica del grupo α-amino. El decaimiento térmico de estos intermediarios da lugar a productos indólico ciclados (HOHICA, Figura 5.3), el cual puede oxidarse adicionalmente a un compuesto ceto descarboxilado bajo condiciones básicas^{17,18,14}.

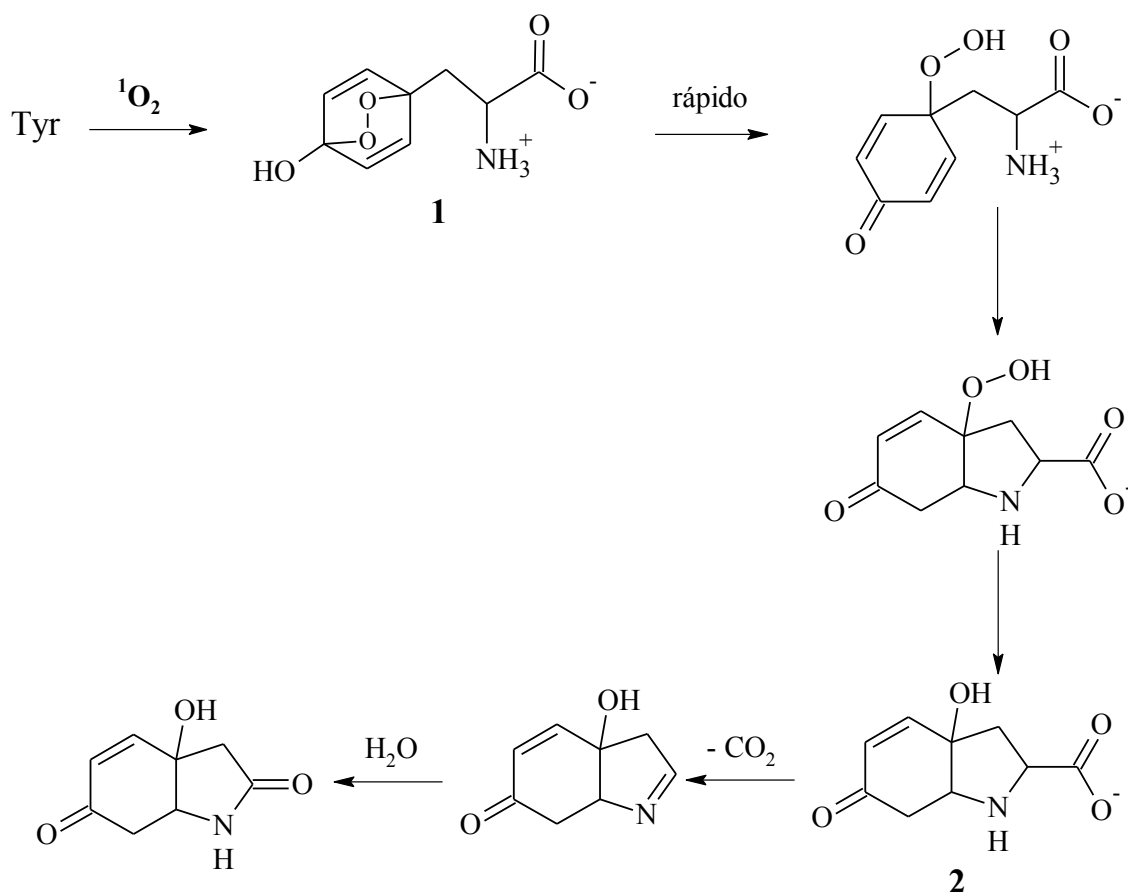


Figura 5.2. Mecanismo de oxidación de Tyr por absorción UV directa y mediante $^1\text{O}_2$. Estructuras de los productos de oxidación: **1**. Endoperoxido Tyr; **2**. HOHICA (*3a-hydroxy-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1H-indol-2-carboxylic acid*).

En péptidos y proteínas, las reacciones de cierre de anillo nucleofílico de los grupos α -amino son menos favorables, debido a la incorporación del enlace peptídico, y por lo tanto la reacción con otros nucleófilos puede competir con la ciclación. Estas adiciones juegan un papel muy importante en el rol del *cross-linking* de una proteína, si sus residuos de aminoácidos más cercanos Lys, Arg ó Cys, proporcionan un centro nucleofílico.

En las reacciones de foto-oxidación de la Tyr por procesos fotosensibilizados, utilizando riboflavina, demuestran la generación de di-tirosina (Tyr_2), verificado por medidas de espectroscopia de ^1H -RMN¹⁹. Este compuesto es un dímero que se forma a partir de la unión de dos moléculas de tirosina a través de un enlace covalente. El enlace carbono-carbono ocurre en la posición orto en relación al grupo $-\text{OH}$ entre ambas tirosinas. Este enlace resulta en la conjugación entre los dos grupos fenólicos, lo que conlleva a un evidente cambio en la absorción y la fluorescencia del dímero comparado con la molécula de tirosina.

Estos dímeros presentan cambios en el espectro de absorción en función del pH, con dos puntos isobécticos en 268 y 291 nm. Además poseen dos máximos de absorción, uno de ellos aparece a 316 nm en condiciones de pH alcalino; Mientras que en medio ácido el máximo se centra en 284 nm. En medio neutro se puede observar ambos máximos, lo que demuestra que las magnitudes relativas de estos espectros tienen cambios característicos en función del pH, con una ionización cerca de pH 7. La fluorescencia de Tyr₂ es característica, debido que tiene una emisión centrada en 405 nm, bajo excitación en 310 nm (soluciones alcalinas) y 284 nm (soluciones ácidas), lo que hace su detección más favorable, ya que su generación se puede evaluar en longitudes de onda diferentes a la Tyr^{20,21}. La Tyr₂, además de ser formada por procesos fotosensibilizados, también se genera por la oxidación de Tyr con peróxido de hidrógeno, bajo irradiación UV del aminoácido en solución^{20,22} y a través de reacciones con oxidantes tales como dióxido de nitrógeno²³, tetranitrometano²⁴, ozono²⁵, y radicales bromo²⁶, en donde la Tyr₂ aparece como producto mayoritario de estas reacciones de oxidación, sean enzimáticas o no.

En otros reportes, se demostró que la fotólisis de Tyr en presencia de una agente fotosensibilizante de ¹O₂, como por ejemplo rosa de bengala, genera Tyr₂ y 3,4-dihidroxyphenylalanine (L-DOPA)^{27,28}, ambos compuestos con muy buenos rendimientos^{29,30,31,16}.

La oxidación de residuos de Tyr, en reacciones fotosensibilizadas en presencia de azul de metileno dió como resultado un mecanismo a través de radicales libres, en donde la luz absorbida lleva a la excitación del fotosensibilizador y luego es reducido por el sustrato, a través de la formación de una semiquinona, mientras el aminoácido es oxidado^{32,33}. Bajo condiciones aeróbicas la formación de semiquinona y del radical aminoácido son adicionalmente oxidadas por el oxígeno molecular y el fotosensibilizador es regenerado y puede comenzar nuevamente el ciclo de reacción. En el caso de la Tyr, el potencial redox podría ser facilitado por la ionización del grupo fenólico. La ionización del grupo α-amino y α-carboxilo de este aminoácido no tienen ningún efecto en la foto-oxidación¹⁴.

5.1.3. Reacciones con residuos de histidina (His)

La absorción directa de luz UV/vis por His no es un mecanismo importante, ya que este aminoácido no absorbe radiación por encima de 230 nm (Capítulo 4), la mayoría de reportes del daño observado para este residuo ocurre vía procesos fotosensibilizados. Este aminoácido en presencia de diferentes fotosensibilizadores, tales como flavinas, conducen a la formación de radicales en el imidazol^{14,34,35}. Estos reportes han demostrado la interacción directa entre el estado triplete del fotosensibilizador y la His. Existen diferentes reportes en donde se indica que la His puede ser oxidada vía producción de 1O_2 ³⁵, generado por procesos fotosensibilizados. Esta reacción ha sido previamente estudiada, y se ha demostrado que ocurre por la formación de uno o más endoperoxidos^{35,36}, los cuales son inestables y llevan al cierre del anillo (Figura 5.4). Por otra parte, se generan diferentes productos de descomposición entre los cuales está el ácido aspártico, aspargina y urea, además de la generación de dímeros de histidina (Figura 5.4). Estos compuestos surgen de la apertura del anillo imidazol y puede ocurrir vía un proceso radical^{35,37}.

Por otra parte, la velocidad de foto-oxidación de His en términos del consumo de oxígeno muestra una marcada dependencia con el pH^{34,38,32} (Figura 5.4). La His reacciona rápidamente con 1O_2 ³⁹, generado fotofísicamente. Esta interacción es en gran parte química ya que la velocidad de reacción tiene un pK alrededor de 6,5, el mismo valor que la disociación del imidazol. La constante de velocidad química (k_q) y total (k_T) tienen un valor muy similar ($1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)³⁹, lo que conlleva a decir que en la reacción fotosensibilizada el mayor aporte está en la k_q .

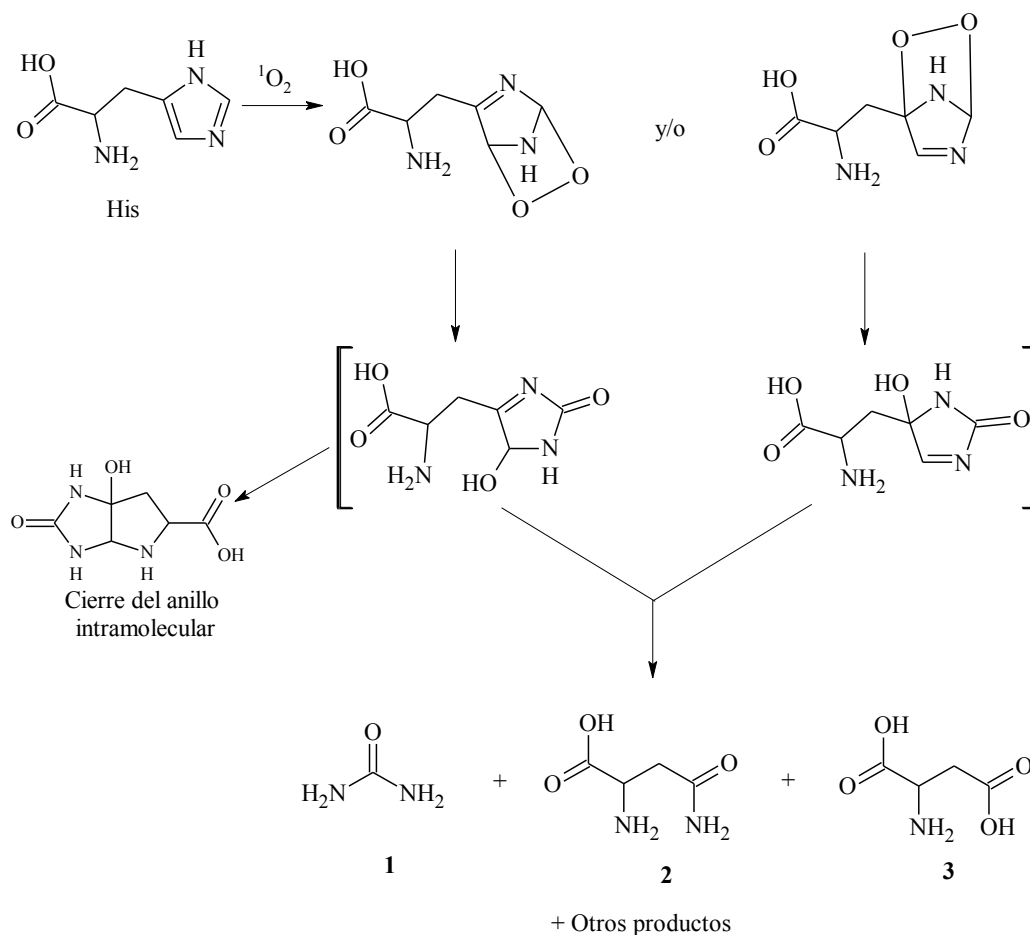


Figura 5.3 Mecanismo de oxidación de His mediante 1O_2 . Estructuras de los productos de oxidación: 1. Urea; 2. Asparagina; 3. Ácido aspártico.

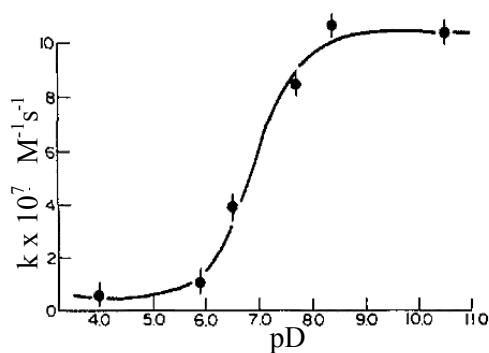
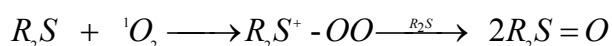


Figura 5.4. Variación de la constante de reacción de histidina para la reacción con oxígeno singlete en D_2O como función del pD³⁹

5.1.4. Reacciones con residuos de metionina (Met)

Los reportes de foto-oxidación de residuos de metionina ha sido estudiada previamente, utilizando como fotosensibilizadores cetonas aromáticas⁴⁰, excitando en la región visible del espectro. El estado triplete que es formado sufre una transferencia de carga con la Met para formar el radical catión, el cual puede someterse a una serie de reacciones dependiendo del pH⁴¹, incluyendo la dimerización y reacciones de desprotonación para formar radicales carbono centradas en radicales C-H adyacentes en la cadena lateral.

La Met puede además ser oxidada por 1O_2 generado por procesos fotosensibilizados^{42,40,43}. Esto lleva a la formación de una especie zwitterionica ($R_2S^+ - OO^-$) el cual depende del pH, ya sea oxidando una segunda molécula de Met (que lleva a la formación de dos moles de Met sulfoxido; MetSO) o eliminar H_2O_2 para formar una mol de MetSO³.



Existen pocas evidencias del daño por radiación UV/Vis a los residuos de Met, aunque estudios previos han demostrado, por espectroscopia de rayos X que la Met es convertida a MetSO y Met⁺, en la presencia y ausencia de O_2 respectivamente⁴⁴.

5.2 Reacciones de fotosensibilización con proteínas

Una de las principales macromoléculas que son objetivo de estudio de procesos de foto-oxidación son las proteínas, debido a su alta abundancia, a la presencia de diferentes cromóforos dentro de su misma estructura, a su alta capacidad de reacción con especies en estado excitado, entre otras.

Existen diferentes rutas de degradación de las proteínas, entre las que se puede mencionar están las reacciones con especies reactivas del oxígeno (ROS). Las cuales producen modificaciones reversibles y/o irreversibles que pueden llevar a la pérdida de la función de la proteína. Estos cambios resultan de modificaciones en la estructura primaria, con cambios asociados en la conformación secundaria y/o terciaria. Además, estas reacciones pueden inducir a fragmentaciones irreversibles, dimerizaciones y/o

oligomerización de las macromoléculas⁴⁵. La importancia de este proceso depende de las características de la proteína, del tipo de ROS y de las interacciones entre las proteínas presentes en el sistema.

La oxidación de los sitios principales de un péptido y proteína, se caracteriza principalmente por atacar los anillos aromáticos y los residuos que contienen azufre. La evaluación de estos procesos proporciona información importante de la oxidación y/o reducción de los residuos de aminoácidos presentes en las proteínas⁴⁶. Particularmente, los radicales libres, son los que en mayor parte dañan estos compuestos, y también especies generadas fotoquímicamente, como por ejemplo el oxígeno singlete. Los radicales pueden reaccionar eficientemente con aminoácidos tales como cisteína (Cys), Trp, y Tyr, llevando a la generación de dímeros de Cys, compuestos oxidados de Trp y aductos de Tyr₂, respectivamente⁴⁷.

La oxidación de residuos de Trp puede llevar a la formación del radical indol, pero se ha establecido que si tal especie es generada en una proteína, que además contiene residuos de Tyr, puede ocurrir rápidamente una transferencia de electrones entre estas especies y llevar a la formación de radicales fenoxil^{46,48}. Esta transferencia puede ocurrir a diferentes distancias dentro de la proteína, pero la velocidad de este proceso es dependiente de la estructura de la proteína.

Diferentes estudios han empleado lisozima (LYZ) y la albúmina de suero humano (HSA) como modelos de proteínas fácilmente oxidables. Estas son dos proteínas globulares solubles en agua que han sido caracterizadas previamente. Se ha demostrado que la interacción de ROS con LYZ lleva a la generación del radical de la proteína y como consecuencia de esto a disminuir su actividad catalítica^{49,50,51}.

Por otra parte, con la HSA se demostró que reacciona inicialmente con ROS en la posición Cys-34⁴⁷, además los dímeros de disulfuro se generan en el plasma humano en presencia de hidroperóxido⁵².

Los resultados presentados con este tipo de proteínas (LYZ y HSA), demostraron que las interacciones con radicales peróxido induce a modificaciones oxidativas, reacciones de *crosslinking* y fragmentaciones⁴⁵. La LYZ posee seis residuos de Trp mientras la HSA tiene solo un residuo. En particular, dos de los residuos de Trp en la Lys está en la superficie y son fácilmente oxidables por radicales^{49,53,54}. Por otra parte, la HSA tiene más residuos de Tyr (18) que la LYZ (3), los cuales pueden asociarse con reacciones de *crosslinking* a través de la formación de enlaces de Tyr₂²¹, y también se han identificado aductos de HSA⁵⁵. Sin embargo es importante aclarar que la reactividad de los residuos

del radical tirosil es mucho menor que la reactividad de otros residuos tales como Trp ó Cys.

Otros reportes han demostrado que la oxidación de albumina de suero bovino (BSA) en presencia de un fotosensibilizador (azul de metileno, MB) que genera eficientemente oxígeno singlete (1O_2), ellos reportan un cambio en el mecanismo de oxidación debido a la incorporación del fotosensibilizador en la estructura de la proteína, pero las características de la formación del enlace entre MB y BSA no son reportadas⁵⁶.

Se han reportado la formación de agregados de alto peso molecular (dímeros y especies mayores) debido a la fotooxidación de proteínas^{57,31,58}. Estos agregados pueden surgir, por ejemplo, de las reacciones radical-radical, tales como la reacción de dos derivados de Tyr (Tyr₂)^{31,58,59}. Muchas de estas reacciones han sido reportadas como las causantes de la formación del *crosslinking*, en algunas ocasiones generándose en condiciones de “oscuridad” después de ser irradiado.

También existe evidencia de la formación de *crosslinking* debido a los residuos de His oxidados^{27,35,59}, esta característica relacionado con los productos de oxidación de la His, los cuales contiene carbonilos que pueden sufrir reacciones de adición con otros nucleófilos.

5.3 Fotosensibilización de aminoácidos y proteínas por compuestos pterínicos

Como se mencionó anteriormente, los fotosensibilizadores estudiados en este grupo son las pterinas, las cuales se encuentran comúnmente en la naturaleza. Bajo irradiación UV-A pueden fluorecer, sometiéndose a fotooxidación y generando diferentes especies reactivas del oxígeno (ROS)⁶⁰ (Capítulo 3).

Experimentos hechos previamente entre la pterina (Ptr), el compuesto básico de las pterinas oxidadas y Trp⁶¹, demostró que el oxígeno molecular era esencial debido que se observaron cambios apreciables en la concentración en función del tiempo de irradiación. La excitación de la Ptr llevó al consumo del aminoácido, mientras el fotosensibilizador se mantiene constante. Aunque se ha reportado que las Ptr son buenos sensibilizadores para la generación de oxígeno singlete ($\Phi = 0.18$ a pH 5,5), se demostró que en esta reacción el mecanismo principal es la transferencia de electrones desde el estado excitado triplete de la Ptr al estado fundamental del aminoácido, generándose así el correspondiente par radical ($Ptr^{\bullet-}$ y $Trp^{\bullet+} / Trp(-H)$), seguido por la

transferencia de electrones de la $Ptr^{\bullet-}$ al O_2 , regenerando la Ptr y produciendo anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), y siguiendo con la generación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

Para confirmar la formación del radical se realizaron experimentos de EPR en presencia de atrapadores de radicales (DMPO y PBN), en donde confirmó con la señal observada de las soluciones irradiadas la formación del radical triptófano centrado en el carbono⁶².

El análisis de fotoproductos confirmó la presencia de compuestos que no podían formarse a través de la oxidación de Trp mediante oxígeno singlete. Se encontró un producto con peso molecular similar al 5-hidroxitriptofano (5-HTP), el cual ha sido identificado en la piel de pacientes que sufren vitíligo⁶³. Asumiendo un mecanismo Tipo I, la formación de 5-HTP puede ser explicada por la adición de aniones hidróxidos (hidratación) y de O_2 en los centros catión y radical de $Trp^{\bullet+}$, respectivamente. También se encontraron productos con pesos moleculares similares a la N-formilquinurenina (NFK), un producto de reacción del Trp con el oxígeno singlete (mecanismo tipo II)⁶¹.

Por otra parte, existen otros reportes con este tipo de fotosensibilizadores y diferentes tipos de proteínas, entre ellas está la albúmina de suero bovino (BSA). Los resultados reportados indican que debido a la reacción, se generan modificaciones químicas y conformacionales en la proteína, evaluados mediante electroforesis (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión molecular. Los cambios espectrales y de fluorescencia, de los diferentes residuos que pueden ser oxidados, indicaron que los residuos de Trp y Tyr se ven afectados⁶⁴.

Todos estos resultados demostraron que la BSA sufre dimerización, por un mecanismo iniciado por la formación de radicales Tyr, y que la oxidación, y posterior degradación, del residuo de Trp conlleva la oligomerización de la proteína. Todas las pruebas confirmaron que el proceso es iniciado por una transferencia de electrones desde el estado fundamental de BSA al estado excitado triplete del fotosensibilizador.

Otro compuesto estudiado con este tipo de fotosensibilizadores fue la tirosinasa, la cual es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles (como la tirosina) y está presente en plantas y animales. Los resultados reportados demostraron que la Ptr puede inactivar a la tirosinasa en un proceso fotosensibilizado, iniciado por una transferencia de electrones⁶⁵. Se indica que debido a esto se ve afectada tanto a la monofenolasa y la actividad de la tirosinasa fenolasa⁶⁵.

Como se ha reportado anteriormente las pterinas están presentes en la piel humana y que particularmente se acumulan en las regiones donde la protección contra la radiación UV

falla. Todos estos reportes son de gran interés debido a la inactivación de la proteína debido a la reacción fotosensibilizada y además la etapa limitante de la velocidad de la biosíntesis de la melanina fotoinducida por pterinas es importante desde el punto de vista biomédico.

Bibliografía

1. Ipiña, A.; Castaño, C.; Dántola, M. L.; Thomas, A. ; *Sol. Energy* **109**, 45 – 53 (2014).
2. Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Tuscott, T. G. ; *Excited states and free radical in biology and medicine* (1993).
3. Straight, R. C.; Spikes, J. D. . ; *Photosensitized oxidation of biomolecules in singlet O₂* (1985).
4. Davies, M. J. . ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **305**, 761–770 (2003).
5. Davies, M. J. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **3**, 17–25 (2004).
6. Wilkinson, F.; Helman, H. P.; and Ross, A. B. . ; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 663–1021 (1995).
7. Nakagawa, M.; Watanabe, H.; Kodato, S.; Okajima, H.; Hino, T.; Flippen, J. L.; Witop, B. . ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **74**, 4730–4733 (1997).
8. Posadaz, A. *et al.* Rose Bengal-Sensitized Photooxidation. 132–138 (2004).
9. Nakagawa, M.; Okajima, H.; Hino, T. ; *J. Am. Chem. Soc.*; **98**, 635–637 (1976).
10. Nakagawa, M.; Okajima, H.; Hino, T. ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **74**, 4730–4733 (1977).
11. Saito, I.; Matsuura, T.; Nakagawa, M.; Hino, T. No Title. *Acc. Chem. Res.*; **10**, 346–352 (1977).
12. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. . ; *Photochem. Photobiol.*; **70**, 391–475 (1999).
13. Yasutsugu, F.; Yasuhiro, K.; Takashi, I. . F. S. ; *J. Biochem.* **92**, 129–141 (1982).
14. Pattison, D. I.; Rahmanto, S.; Davies, M. J. Photo-oxidation of proteins. *Photochem* 38–53 (2012). doi:10.1039/c1pp05164d
15. Mizdrak, J.; Hains, P. G.; Truscott, R. J.; Jaime, J. F.; Davies, M. ; *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1108–1119 (2008).
16. Parker, N. R.; Jaime, J. F.; Davies, M. J.; Truscott, R. J. . ; *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1479–1489 (2004).
17. Criado, S.; Soltermann, J. M.; Marioli, J. M.; García, N. A. ; *Photochem. Photobiol.* **68**, 453–458 (1998).
18. Katsuya, E.; Seya, K.; Hikino, H. . ; *J. Chem. Soc., Chem Commun*; 934–935 (1988).
19. Silva, E.; Godoy, J. ; *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **64**, 253–256 (1994).
20. Bialkowski, S. T. E. P. H. E. N. E. Laser-Excited Fluorescence of Dityrosine. **49**, (1995).
21. Giulivi, C.; Traaseth, N. J.; Davies, K. J. . ; *Amin. Acids*; **25**, 227–232 (2003).
22. Lehrer, S. S.; Fasman, G. D. . ; *Biochemistry*; **6**, 757 (1967).
23. Kikugawa, K.; Kato, T.; Okamoto, Y. . ; *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 373 (1994).
24. Williams, J.; Lowe, M. J. . ; *Biochem. J.*; **121**, 203 (1971).
25. Verweij, H.; Christianse, K.; Steveninck, J. . ; *Biochim. Biophys. Acta.*; **701**, 180 (1982).
26. Hashimoto, S.; Seki, H.; Masuda, T.; Imamura, M.; Kondo, M. . ; *J. Radiat. Biol.*; **40**, 31 (1981).
27. Balasubramanian, D.; Du, X.; Zingler, J. S. J. . ; *Photochem. Photobiol.*; **5**, 159–161 (1990).
28. Balasubramanian, D.; Kanwar, R. . ; *Mol. Cell. Biochem.* **234**, 27–38 (2002).
29. Gros vendor, A. J.; Mortor, J.D.; Dyer, J. M. . ; *Amin. Acids*; 285–296 (2009).
30. Nikogosyan, D. N.; Gorner, H. . ; *Photochem. Photobiol., B.*; **13**, 219–234 (1992).
31. Lam, M. A.; Pattison, D. I.; Bottle, S. E.; Keddie, D. J.; Davies, M. J. . ; *Chem. Res.*

- Toxicol.*; **21**, 2111–2119 (2008).
32. Weil, L. .; *Arch. Biochem. Biophys.*; **110**, 57–68 (1965).
33. Nishimura, S.; Ozawa, H. .; *Biochim. Biophys. Acta.*; **55**, 421 (1962).
34. Huvaere, K.; Skibsted, L. H. .; *J. Am. Chem. Soc.*; **131**, 8049–8060 (2009).
35. Agon, V. V.; Bubbs, W. A.; Writhing, A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J. .; *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 698–710 (2006).
36. Tomita, M.; Irie, M.; Ukita, T. .; *Biochemistry* **8**, 5149–5160 (1969).
37. Chang, S. H.; Teshima, G.M.; Milby, T.; Gillece-Castro, B.; Canova-Davis, E. .; *Anal. Biochem.* **244**, 221–227 (1997).
38. Sluyterman, L. A. A. E. Photo-oxidation, sensitized by proflavine., **60**, 557–561 (1962).
39. MATHeson, I. B. C.; Lee, J. . CHEMICAL REACTION RATES OF AMINO ACIDS. *Photochem. Photobiol.* **29**, 879–881 (1979).
40. Sch, C. Methionine oxidation by reactive oxygen species : reaction mechanisms and relevance to Alzheimer ' s disease. **1703**, 111–119 (2005).
41. Hug, G. L.; Bobrowski, K.; Kozubek, H.; Marciniak, B. .; *Photochem. Photobiol.* **68**, 785–796 (1998).
42. Davies, M. J.; Truscott, R. J. W. .; *J. Photochem. Photobiol. B.*; **63**, 114–125 (2001).
43. Ronsein, G. E.; Miyamoto, S.; Bechara, E.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R. .; *Quim. Nov.* **29**, 563–568 (2006).
44. Karunakaran-Datt, A.; Kennepohl, P. .; *J. Am. Chem. Soc.*; **131**, 3577–3582 (2009).
45. Arenas, A.; Vasquez, R.; Lopez, C.; Lissi, E.; Silva, E. . Oxidation Damage of lysozyme and human serum albumin. *Protein J* **30**, 359–365 (2011).
46. Klapper, M. H.; Faraggi, M. .; *Q. Rev. Biophys.*; **12**, 465–519 (1997).
47. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. .; *Free Radical Biology and Medicine*; (2000).
48. DeFelippis, M. R.; Faraggi, M.; Klapper, M. H. .; *J. Am. Chem. Soc.*; **65**, 537–561 (1990).
49. Lissi, E.; Clavero, N. .; *Free Radic. Res Comm* **10**, 177–184 (1990).
50. Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Fauré, M. .; *Xenobiotica*; **21**, 995–1001 (1991).
51. Zhu, H.; Chen, S.; Yao, S.; Wang, W. .; *J. Photochem Photobiol. B.* **94**, 125–130 (2009).
52. Ogasawara, Y.; Namai, T.; Togawa, T.; Ishii, K. .; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **340**, 353–358 (2006).
53. Lissi, E.; Faure, M.; Clavero, N. .; *Free Radic. Res Comm* **14**, 373–384 (1991).
54. Zhang, Z. X.; Zhao, H. W.; Zhu, H. P.; Ge, M.; Wang, W. F.; Yao, S. D.; Li, W. X. .; *Sci Chin (Ser B)*; **50**, 84–90 (2007).
55. Iwao, Y.; ASnraku, M.; Hirake, M.; Kawai, K.; Nakajou, K. .; *Drug. Metab. Pharmacokinet* **21**, 140–146 (2006).
56. Alarc, E. *et al.* ; *J. Photochem Photobiol. B.* **33**, 93–102 (2010).
57. Dubbelman, T. M.; Hassnoot, C.; Steveninck, J. .; *Biochim. Biophys. Acta.*; **601**, 220–227 (1980).
58. Dalsgaard, T. K.; Otzen, D.; Nielsen, J. H.; Larsen, L. B. .; *J. Agric. Food. Chem* **55**, 10968–10976 (2007).
59. Shen, H. R.; Spikes, J. D.; Kopecekova, P.; Kopecek, J. .; *J. Photochem Photobiol. B.* **34**, 203–210 (1996).
60. Lorente, C.; Thomas, A. .; *Acc. Chem. Res.* **39**, 395–402 (2006).
61. Thomas, A. H. *et al.* ; *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 467–475 (2013).
62. Candeias, L. P.; Wanderman, P.; Manson, M. P. .; *Biophys. Chem.*; **67**, 229–237 (1997).
63. Schallreuter, K. U.; Salem, M. A.; Gibbons, N. C.; Martinez, A.; Slominski, R. .; *FASEB J.* **26**, 2457–2470 (2012).
64. Thomas, A. H. *et al.* ; *J. Photochem Photobiol. B.* **141**, 262–268 (2014).
65. Dántola, M. L.; Gojanovich, A. D.; Thomas, A. H. .; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **424**, 568–572 (2012).

PARTE II

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Capítulo 6: Preparación e Irradiación Estacionaria de Soluciones

La exposición de una muestra a radiación proveniente de una lámpara, con intensidad conocida y constante, durante un periodo de tiempo prolongado se denomina irradiación continua. La condición de período prolongado, se refiere a la duración de la iluminación respecto a las técnicas de fotólisis de destello, en las cuales la irradiación puede durar desde el orden de milisegundos hasta femtosegundos, dependiendo de la técnica que se emplee. Los experimentos en los cuales se estudia una reacción fotoquímica inducida por irradiación continua se denominan genéricamente fotólisis continuas o estacionarias. Este tipo de reacciones ocurren, siempre que pueda producirse una absorción de luz por parte de un compuesto, lo que genera un estado electrónicamente excitado, el cual es más energético y más reactivo que el estado fundamental. En este capítulo, se presentan los procedimientos que se emplearon para preparar e irradiar las soluciones acuosas en forma continua, y se explica la técnica empleada para medir la radiación que llega hasta la celda en determinado tiempo de irradiación.

6.1 Reactivos

Las pterinas utilizadas en este trabajo de tesis fueron sintetizadas por el Laboratorio Schircks (Suiza). Todas fueron usadas sin posterior purificación, debido a que presentan una pureza mayor al 99%. Los compuestos usados en este trabajo fueron pterinas oxidadas, específicamente: pterina (Ptr), 6-metilpterina (Mep).

Los sustratos utilizados para las reacciones fueron:

Aminoácidos: Tirosina (Tyr), Histidina (His) y Metionina (Met) provistos por Sigma Aldrich con pureza de 99.0%, 99.0% y 98.0%, respectivamente

Péptidos: La hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) (*Capítulo 4, Sección 4.3.1*) fue adquirida en Sigma-Aldrich con una pureza del 97.0%.

Se realizaron mutaciones a la secuencia de α -MSH, para estudiar las reacciones sobre algunos aminoácidos específicos evitando interferencias en el análisis debido a otros. Las mutaciones fueron las siguientes:

Tabla 6.1. Secuencia de α -MSH y de los péptidos mutados

Péptido	Secuencia
α-MSH	Ac-Ser ¹ -Tyr ² -Ser ³ -Met ⁴ -Glu ⁵ -His ⁶ -Phe ⁷ -Arg ⁸ -Trp ⁹ -Gly ¹⁰ -Lys ¹¹ -Pro ¹² -Val ¹³ -NH ₂
α-MSH_{Y2G}	Ac-Ser ¹ -Gly ² -Ser ³ -Met ⁴ -Glu ⁵ -His ⁶ -Phe ⁷ -Arg ⁸ -Trp ⁹ -Gly ¹⁰ -Lys ¹¹ -Pro ¹² -Val ¹³ -NH ₂
α-MSH_{W9G}	Ac-Ser ¹ -Tyr ² -Ser ³ -Met ⁴ -Glu ⁵ -His ⁶ -Phe ⁷ -Arg ⁸ -Gly ⁹ -Gly ¹⁰ -Lys ¹¹ -Pro ¹² -Val ¹³ -NH ₂
α-MSH_{(Y2G)(W9G)}	Ac-Ser ¹ -Gly ² -Ser ³ -Met ⁴ -Glu ⁵ -His ⁶ -Phe ⁷ -Arg ⁸ -Gly ⁹ -Gly ¹⁰ -Lys ¹¹ -Pro ¹² -Val ¹³ -NH ₂

En el péptido α -MSH_{Y2G}, se mutó el residuo de Tyr en la posición 2 por una glicina (Gly), sobre la secuencia de la α -MSH. En α -MSH_{W9G}, se mutó el residuo de Trp en la posición 9 por un residuo de Gly. Por último, en el péptido α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, se mutaron los residuos de Trp y Tyr simultáneamente por Gly. Los tres péptidos mutados, α -MSH_{Y2G}, α -MSH_{W9G} y α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, fueron sintetizados por el laboratorio CASLO (Dinamarca), con una pureza de 99.11%, 99.87% y 99.81%, respectivamente.

Otros reactivos utilizados para realizar los experimentos fueron: NaOH, HCl y H₂O₂ provistos por Merck, D₂O (> 99.9%, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio deuterado (NaOD, Sigma Aldrich, 99.5%) y ácido clorhídrico deuterado (DCl, Aldrich, 99%). Acetato de amonio (AcNH₄, Sigma Aldrich, 98%), acetonitrilo calidad HPLC (J. T. Baker). También se utilizó yoduro de potasio (KI, Laboratios Cicarelli, 99%), superóxido dismutasa (SOD, Sigma Aldrich) de eritrocito bovino. El agua que se utilizó para preparar las soluciones fue calidad Milli Q (agua destilada purificada en un equipo Milli Q Reagent Water System (resistividad~10MΩ cm⁻¹)).

6.2 Preparación de soluciones

6.2.1 Soluciones stock

Aunque los fotosensibilizadores usados son bastante fotoestables (Capítulo 3), para evitar su degradación se prepararon todas las soluciones en un cuarto oscuro, iluminado solo con una luz roja. Inicialmente, para la preparación de las soluciones se disuelve el sólido en agua libre de iones metálicos. Como se mencionó en el Capítulo 2, las pterinas presentan grupos ionizables, los cuales en medio alcalino favorecen su disolución en comparación con el medio ácido. Debido a esto, a las soluciones acuosas se les agregó

unos microlitros de NaOH 0.5-1M (~ 10-100μl). Luego se mantuvo en agitación alrededor de una hora hasta lograr la completa disolución.

Para determinar la concentración exacta de las soluciones empleadas, se utilizaron diferentes métodos:

Método 1. Por medio de la cantidad de sólido pesado, el volumen preparado y el peso molecular del compuesto.

Método 2: A partir de factor de dilución y concentración (calculada por el método 1) de una solución más concentrada.

Método 3: A partir de las medidas de absorbancia y los correspondientes valores de absorción molar a una determinada longitud de onda ($\epsilon_{(\lambda)}$), utilizando la ecuación de Beer-Lambert:

$$[C] = \frac{A_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda}^c l} \quad (6.1)$$

Donde [C] es la concentración del compuesto calculado, A_{λ} es el valor de absorbancia a la longitud de onda determinada (λ) y l es el camino óptico en cm.

Las soluciones de pterinas aromáticas son estables alrededor de una semana luego de su preparación y las concentraciones fueron calculadas por el método 3, las cuales variaron entre 50 y 130μM.

Por otra parte, los aminoácidos son muy solubles en agua a las concentraciones trabajadas. Las soluciones fueron preparadas a pH neutro. Para el cálculo de la concentración se compararon los valores por el método 1 y 3 y se obtuvieron valores similares, dentro del error experimental. En la Tabla 6.2 se presentan los valores de los coeficientes de extinción molar utilizados para el cálculo de las concentraciones de los aminoácidos. Las concentraciones de las soluciones de los aminoácidos trabajados fueron para Tyr e His~100μM, y para Met~600μM.

Tabla 6.2. Coeficientes de extinción molar de aminoácidos a sus respectivas longitudes de onda.

Aminoácido	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Tirosina (Tyr)	274	1400 ^{1,2}
Histidina (His)	211	5900 ^{1,3}
Metionina (Met)	214	980 ^{1,3}

En el caso de α -MSH, las soluciones fueron preparadas disolviendo el sólido en agua hasta llegar a una concentración aproximada de 60 μ M, la cual se calculó por el método 3. En este caso se calculó el coeficiente de absorción molar (ϵ) a 270 nm, sumando los valores de ϵ a dicha longitud de onda de los dos cromóforos, Trp y Tyr ($\epsilon_{Trp}^{270nm} + \epsilon_{Tyr}^{270nm} = 6982 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} + 1478 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 8460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Las soluciones de los péptidos mutados, se prepararon disolviendo 5mg del péptido en 15ml de agua, se agitó aproximadamente media hora y luego se midió la absorbancia teniendo en cuenta los cromóforos principales en cada cadena. Se calculó la concentración con el mismo coeficiente de absorción del aminoácido libre utilizando el método 3. En la Tabla 6.3 se presentan los coeficientes utilizados para cada péptido. Esta solución se fraccionó en alícuotas de 1ml y se almacenaron a -18 °C para usos posteriores. Se hicieron pruebas de estabilidad donde se observó que las soluciones eran estables por largos periodos de tiempo.

Tabla 6.3. Coeficientes de extinción molar de péptidos mutados a sus respectivas longitudes de onda.

Péptido	Cromóforos	λ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
α -MSH	(-Trp-)(-Tyr-)	270	8460
α -MSH _{Y2G}	-Trp-	219	46700
α -MSH _{W9G}	-Tyr-	274	1400
α -MSH _{(Y2G)(W9G)}	-Phe-	257	200

6.2.2 Soluciones para irradiar

Se realizaron mezclas del sustrato (aminoácido ó péptido) con el fotosensibilizador a una determinada concentración. El pH de trabajo, dependió del compuesto utilizado y del experimento en particular, pero en general se trabajó a pH 5,5. De esta manera, en las soluciones de trabajo solo estaba presente una única forma ácido-base, la forma neutra (Capítulo 2). En el caso de la His se realizaron algunos experimentos a pH 10,5, donde las pterinas están presentes en más de un 99.0% en su forma desprotonada.

Para el ajuste de pH, se preparó una solución concentrada del reactivo comercial, en el caso del HCl, y por pesada del sólido, en el caso del NaOH. Las concentraciones de estas soluciones variaron entre 0,1 y 2M. Las medidas de pH se realizaron con dos pH-metros, el primero con referencia, pHM82, Radiometer Copenhagen en combinación

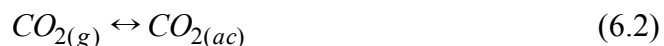
con electrodo de pH (pHC3001-9, Radiometer Analytical) y el segundo un pH SensION pH31, HACH en combinación con un electrodo de referencia 50 10T. La calibración de los equipos de pH, se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de 4,01; 7,00; y 10,00. Es necesario destacar que no se utilizaron soluciones reguladoras para ajustar el pH de las soluciones debido a que se sabe que ciertos aniones, como por ejemplo el fosfato y acetato, son capaces de desactivar los estados excitados tripletes de las pterinas⁴.

6.2.2 Condiciones anaeróbicas y de saturación de O_2

En algunos experimentos realizados en este trabajo, se evaluó el efecto del oxígeno (O_2) disuelto en la solución para obtener información sobre el mecanismo de reacción. Para tal fin, se realizaron las pruebas de la siguiente manera: las soluciones que se prepararon de acuerdo a lo descrito en la Sección 6.2.1, se pusieron en celdas de cuarzo de 1cm x 1cm ò 1cm x 0.4cm, con tapa rosca y *septum* de silicona. Se colocaron dos agujas atravesando el *septum*, una de ellas se introdujo hasta el fondo de la celda y sirvió como vía de entrada del gas, mientras la otra se dejó por encima de la superficie de la solución, como vía de salida. De esta manera se burbujearon las soluciones con el gas por 20 minutos. Al finalizar el tiempo de burbujeo, se extraen las agujas, retirando primero la aguja de salida y de esta manera generar una pequeña sobre-presión, luego se extrae la aguja de entrada y se cubre la parte superior de la celda con papel *parafilm*, para evitar la entrada de gases.

Este procedimiento se empleó para eliminar el O_2 , burbujear el gas inerte Argón (Ar) y para aumentar la concentración de O_2 . En las soluciones saturadas en O_2 , la concentración de este gas es aproximadamente 5 veces superior a la de soluciones equilibradas con aire (1,28mM a 25°C).

Es importante aclarar que durante el tiempo que se realizan los burbujeos, también se elimina el CO_2 presente, el cual se encuentra en equilibrio con H_2CO_3 , el cual es un ácido débil que en solución acuosa, se encuentra parcialmente disociado. Por lo tanto, al eliminarse el CO_2 , los equilibrios de las reacciones (6.2), (6.3) y (6.4) son desplazados hacia la izquierda, disminuyendo así la concentración de protones, con la consecuente alcalinización de la solución.



Sabiendo que las propiedades espectrales de las pterinas, dependen del cambio de pH (Capítulo 2), se utilizó esta propiedad como indicador directo del pH de la solución. Se tomaron los espectros de absorción, antes y después, de burbujear, para controlar que no hubiera un cambio en la forma ácido- base del derivado pterínico.

En algunos casos, un burbujeo por tiempos prolongados puede provocar la pérdida de cantidades substanciales de solvente, por arrastre de moléculas de agua con la corriente de gas, lo que puede llevar al cambio en las concentraciones de la solución. Para evitar esta situación, los gases (que se encuentran libre de moléculas de agua) se hicieron pasar por una trampa de agua, para saturar el gas con dicha sustancia antes de burbujear la solución y se controló la concentración de la solución por espectros de absorción después de burbujear.

6.3 Irradiación estacionaria de las soluciones

6.3.1 Sistema de irradiación

Para la irradiación estacionaria de las soluciones en todos los experimentos se utilizaron lámparas *Rayonet Photochemical Reactor Lamp*, RPR 3500A, fabricadas por la empresa *Southern N. E. Ultraviolet Co.* Estas lámparas emiten radiación de 350 nm, con un ancho total a mitad del máximo (ATMM) de emisión de la lámpara⁵ aproximado de 30nm. En general se trabajó con dos sistemas de irradiación de diferente geometría, lo cual dependió principalmente del sustrato utilizado en los experimentos de fotosensibilización

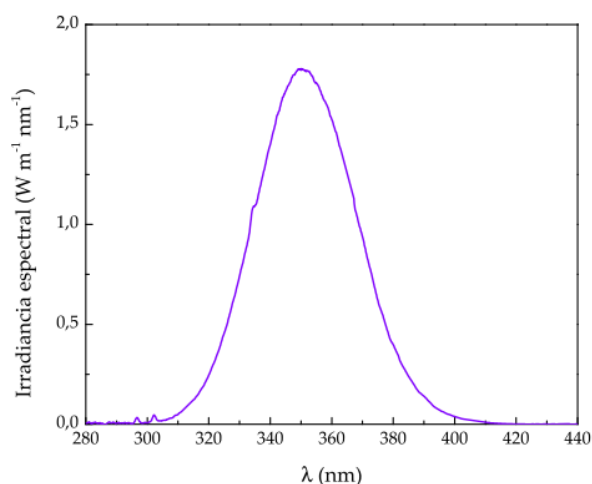


Figura 6.1. Espectros de emisión de la lámpara RPR 3500 A

- ✓ *Sistema I de irradiación:* Se utilizó una sola lámpara. Se utilizaron celdas de absorción de cuarzo (*Hellma*) de dimensiones de 1 x 0,4cm y capacidad volumétrica de 1200 μ l. La distancia de la celda a la lámpara varió dependiendo del experimento, en algunas condiciones se trabajó pegado a la lámpara, mientras que otras pruebas fueron realizadas con la celda a 2cm de la misma, medidos desde la cara exterior de la celda. Se irradió siempre por camino óptico 1cm (Figura 6.2). Este sistema se utilizó con los aminoácidos Tyr, His, y con los péptidos α -MSH, α -MSH_{Y2G}, α -MSH_{W9G} y α -MSH_{(Y2G)(W9G)}.
- ✓ *Sistema II de irradiación:* Dos lámparas Rayonet RPR 3500 A, puestas una frente a la otra, con una celda de absorbancia de 1 cm x 1 cm, en medio de ellas, ambas lámparas se ubicaron pegadas a la cara opuesta a la celda. Este sistema de irradiación se utilizó con el aminoácido Met.

Las soluciones se homogenizaron durante la irradiación con agitación magnética, logrando la distribución de los reactivos y productos, y evitando la acumulación de estos últimos en las zonas cercanas a la cara por la que se está irradiando la celda.

Los sistemas fueron ubicados dentro de una “caja negra”, para evitar el ingreso de luz proveniente desde el exterior. El tiempo de irradiación fue medido con un cronómetro en el mismo instante que la lámpara se encendió. La geometría fue la misma dentro de cada experimento. Además, la posición de la celda con respecto a la lámpara fue invariable entre experimento y experimento. El volumen de solución irradiado para las

soluciones del sistema I fue 1ml y para las soluciones irradiadas con el sistema II fue 3ml.

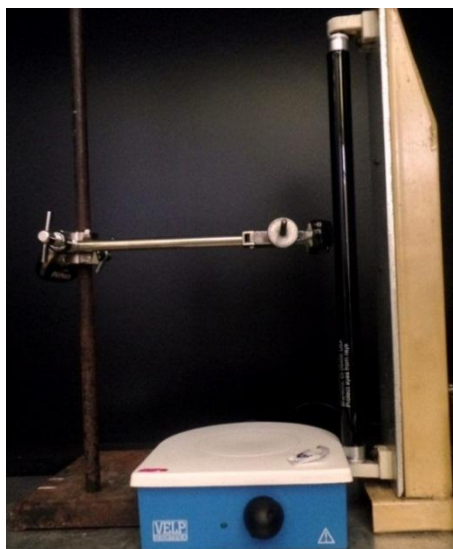


Figura 6.2. Esquema de irradiación

6.3.2 Metodología general para la toma de las muestras

En cada experimento de fotólisis continua, se extrajeron muestras a distintos tiempos de irradiación para su posterior análisis. Con este fin se adoptaron dos procedimientos generales:

- ✓ *Medidas realizadas sobre distintas alícuotas de la solución original.* Se pone la alícuota de la solución en la celda, se irradia durante un periodo de tiempo determinado para cada experimento. Al terminar, se apaga la lámpara y se retira la cantidad necesaria para el análisis y el resto de muestra se descarta. Se vuelve a cargar la celda con solución fresca y se repite esta misma operación, pero irradiando esta vez un tiempo diferente, generalmente mayor que el primero.
- ✓ *Medidas realizadas sobre la misma alícuota de la solución original.* Se introduce la solución en la celda, se irradia durante un periodo de tiempo, luego se apaga la lámpara, se saca una alícuota y se realiza la medida. Posteriormente se vuelve a encender la lámpara, se irradia la muestra durante otro periodo de tiempo y así sucesivamente. Se procede así, irradiando y analizando la solución sin sacarla de la celda completamente.

6.4 Experimentos en condiciones especiales para determinación de mecanismo

6.4.1 Experimentos en presencia de yoduro de potasio (KI)

Algunos iones inorgánicos actúan como desactivadores de estados excitados de moléculas orgánicas, fenómeno que se conoce como efecto del átomo pesado⁶. El anión desactiva tanto los estados singletes como tripletes de las pterinas⁷, siguiendo un comportamiento de Stern-Volmer (Capítulo 1), Ecuación (6.7):



$$\frac{\tau_s^0}{\tau_s} = 1 + k_q^s \tau_s^0 [I^-] \quad (6.7)$$

$$\frac{\tau_T^0}{\tau_T} = 1 + k_q^T \tau_T^0 [I^-]$$

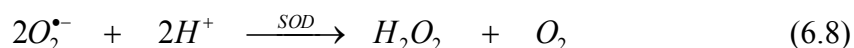
donde en subíndice “S” y “T” representan el estado singlete y triplete respectivamente, τ^0 y τ son los tiempos de vida del estado excitado en ausencia y presencia de I^- , $[I^-]$ representa la concentración de I^- (mol L⁻¹), y k_q es, en el caso de Ptr, el valor de las constantes de desactivación para el estado singlete ($k_q^S = (9 \pm 1) \times 10^9$ M⁻¹s⁻¹) y triplete ($k_q^T = (4,9 \pm 0.6) \times 10^9$ M⁻¹s⁻¹), las cuales son similares, pero debido a la diferencia en los tiempos de vida de los correspondientes estados excitados, se puede desactivar selectivamente uno u otro, eligiendo la concentración adecuada de I^- . Es decir, para desactivar el 99% del estado excitado S₁, es suficiente con una concentración de 0.1M, mientras que para desactivar el mismo porcentaje de T₁ sólo es necesario 500μM. Considerando esto, en estas condiciones casi todos los estados tripletes son desactivados por el I^- , mientras que la desactivación de los singletes es menor al 2%.

El procedimiento general de estos experimentos implica la irradiación continua de soluciones acuosas del sustrato y fotosensibilizador en presencia y ausencia de KI (200-500 μM) en idénticas condiciones experimentales (pH, geometría de irradiación,

intensidad de radiación, concentración de reactivos, etc.). Luego se comparan las velocidades de consumo del sustrato en presencia y en ausencia del apagador. En términos generales, si la velocidad de consumo en presencia de I^- muestra una inhibición, en comparación con la velocidad en ausencia, se puede concluir que el estado excitado triplete del sensibilizador es el responsable del proceso fotoquímico.

6.4.2 Experimentos en presencia de superóxido dismutasa (SOD)

Para estudiar la participación de $O_2^{\bullet-}$, en el mecanismo de reacción, se realizaron experimentos en presencia de SOD. Esta enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 , eliminándolo del medio (Reacción (6.8)).



La solución de la enzima se preparó a partir de la masa del sólido, y luego se disolvió en agua. Esta solución fue fraccionada en alícuotas de 500 μ l y se almacenó a -18 °C, para usos posteriores. Se comprobó la estabilidad de la enzima antes y después de ser congelada. Al momento de utilizar la solución para el experimento, se descongeló la muestra y se tomó la alícuota necesaria a la mezcla de reacción. Para estos experimentos se utilizó 50 U/ml, concentración suficiente para eliminar todo el $O_2^{\bullet-}$ del medio⁸.

La mezcla, en donde está presente el fotosensibilizador, el sustrato y SOD, se irradió en idénticas condiciones experimentales y se comparó con las muestras irradiadas en ausencia de la enzima. De esta forma se puede evaluar la participación de $O_2^{\bullet-}$ en el proceso fotosensibilizado.

6.4.3 Experimentos comparativos en H_2O y D_2O

El agua deuterada (D_2O), o agua pesada, corresponde una molécula de composición química equivalente al agua (H_2O), en la que los dos átomos del hidrógeno, son sustituidos por dos deuterios, un isótopo pesado del hidrógeno. Este solvente disminuye la velocidad de desactivación del 1O_2 aproximadamente en un orden de magnitud, debido a que las interacciones vibracionales disminuyen. Esto da como resultado, que el tiempo de vida del 1O_2 (τ_Δ) en D_2O es mayor que en H_2O ($\tau_\Delta^{H_2O} \sim 3\mu s$ y $\tau_\Delta^{D_2O} \sim 63\mu s$)^{9,10,11}.

Esta propiedad puede ser utilizada como técnica experimental para evaluar la participación del 1O_2 en los procesos fotosensibilizados. Para esto se preparan soluciones, de las mismas concentraciones del sensibilizador y del sustrato en D_2O y H_2O y se irradian en las mismas condiciones para luego comparar las velocidades de consumo del sustrato. Las reacciones en las que participa 1O_2 aumentarán su velocidad en comparación con H_2O . Por el contrario, las reacciones que no ocurren a través de 1O_2 no sufrirán modificaciones de su velocidad al cambiar el solvente.

Las concentraciones de pterinas pueden ser más elevadas en el solvente deuterado que en H_2O . Por esto, se alcaliniza el D_2O a $pH \sim 11$ a la cual se le adiciona el sólido y se deja agitando por un periodo de una hora, sellando los envases con papel parafilm, para evitar el intercambio de D_2O con H_2O proveniente de la humedad del ambiente. La concentración se determinó mediante el espectro de absorción. El pD ($pD = -\log [D^+]$) fue medido con el pH -metro nombrado en la sección 5.2.1 y los valores de pD se calcularon aplicando la corrección a cada medida de pH por la Ecuación (6.9), donde pH es el valor leído en el instrumento¹². El valor final de pD se alcanza mediante agregados con micropipeta de pequeños volúmenes de soluciones concentradas de $NaOD$ y DCl en D_2O .

$$pD = pH + 0.4 \quad (6.9)$$

6.5 Actinometría

Teniendo en cuenta, que dentro de la solución existe una única especie química que absorbe radiación, a la longitud de onda que se está excitando, la ley de Lambert-Beer se puede expresar según la Ecuación (6.10).

$$q_{p,\lambda} = q_{p,\lambda}^0 (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda)l C}) \quad (6.10)$$

Donde $q_{p,\lambda}$ es el flujo fotónico absorbido por el soluto que se encuentra en la solución con una concentración molar C a una determinada λ , $q_{p,\lambda}^0$ es el flujo fotónico incidente, $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar a λ y l es el camino óptico. Por otra parte, $q_{p,\lambda}$ es igual al número de fotones (cuantos, N) por unidad de tiempo, ($\partial N / \partial t$, expresión simplificada: $q_{p,\lambda} = N / t$, cuando el número de fotones es constante a lo largo del tiempo considerado). La unidad en el sistema internacional (SI) es s^{-1} . Este término se puede

utilizar, alternatively, con la cantidad de moles de fotones (einsteins), siendo entonces sus unidades en el SI¹³ mol s^{-1} .

En el campo de la fotoquímica es más útil el parámetro densidad de flujo fotónico ($q_{p,\lambda}^0$), que se puede definir como el número de fotones absorbidos por el soluto por unidad de tiempo y por unidad de volumen¹³. Siendo “V” el volumen de la solución, la relación $q_{p,\lambda}$ y $q_{p,\lambda}^0$ se puede expresar de la siguiente manera:

$$q_{p,\lambda}^V = \frac{q_{p,\lambda}}{V} \quad (6.11)$$

Para determinar $q_{p,\lambda}^0$ se utilizó un compuesto denominado *Aberchrome 540* (Aberchromics Ltd) como actinómetro químico. Este compuesto es el anhído del ácido (E) α -(2,5-dimetil-3-furiletiliden) (isopropiliden) Succínico (DFIS), que al ser irradiado con una longitud de onda entre 310 y 370nm adquiere un color intenso correspondiente al 7,7a-dihidro2,4,7,7a-pentametilbenzo[b]furano (7,7a-DHBF). Este producto posee una banda de absorción entre 436 y 546nm y si es excitado en este intervalo, la reacción ocurre en sentido inverso. En la Figura 6.3(a), se presentan las estructuras químicas de las dos especies y sus respectivos espectros de absorción.

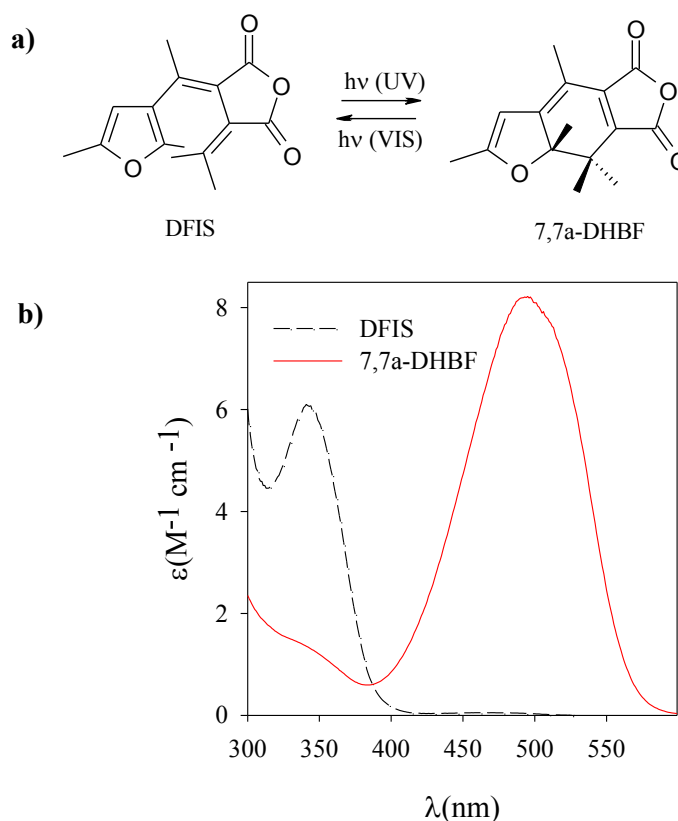


Figura 6.3. Estructura química de *Aberchrome 540* y espectros de absorción de los dos isómeros usando tolueno como solvente

El *Aberchrome 540* se puede utilizar en diferentes solventes, pero en este caso se diluyó en tolueno. La longitud de onda del máximo de absorción del DFIS no depende de la naturaleza del solvente ($\lambda_{\max}(\text{DFIS}) = 343\text{nm}$, $\epsilon_{(\text{DFIS})} = 6077 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Por otra parte, la λ máxima de absorción del 7,7a-DHBF varía considerablemente según el solvente en el que se encuentra disuelto ($\lambda_{\max}(\text{DHBF}) = 494\text{nm}$, $\epsilon_{(\text{DHBF})} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en tolueno).

En el UV, la actinometría se realiza preparando una solución de DFIS, irradiando a distintos tiempos y siguiendo la absorbancia de 7,7a-DHBF a 494 nm (λ_{\max}) en función del tiempo. En cambio, a longitudes de ondas mayores, el isómero que se irradia es el 7,7a-DHBF. La $q_{p,\lambda}^V$ se puede calcular a partir de la siguiente Ecuación:

$$q_{p,v}^V = \frac{\partial [7,7a \text{ DHBF}]}{\partial t} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad (6.12)$$

Donde Φ_{Ac} , es definido como el rendimiento cuántico del actinómetro, cuyo valor es 0.2 para la conversión de DFIS a 7,7a-DHBF por radiación UV y es independiente del solvente usado.

Si utilizamos la ley de Lambert-Beer, se puede definir la siguiente expresión que relaciona la concentración de 7,7a-DHBF con la absorbancia (A^{494}) y el coeficiente absorción molar (ϵ^{494}):

$$[7,7a - \text{DHBF}] = \frac{A^{494}}{\epsilon^{494} l} \quad (6.13)$$

Reemplazando en la Ecuación (6.14) podemos obtener lo siguiente:

$$q_{p,v}^V = \frac{\partial A^{494} / \partial t}{\epsilon^{494} l} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad (6.14)$$

La actinometría, entonces se realizó en el intervalo de 300-400nm, para poder obtener el valor de $q_{p,\lambda}^V$, con irradiaciones continuas y con el mismo camino óptico y volumen de la muestra durante diferentes periodos de tiempo, entre los cuales se midió la absorbancia a 494 nm. Con estos datos se realizó una gráfica en función de tiempo de irradiación y se ajustó a una recta con una regresión lineal. Aplicando la Ecuación (6.14), se obtiene el valor de $q_{p,\lambda}^V$. En la Figura 3, se presentan los espectros de

absorción que se obtuvo al irradiar DFSI en una celda por camino óptico 1cm y con una lámpara Rayonet RPR 3500A pegado a la lámpara.

Al absorber el 99% por parte del actinómetro, se concluye que $q_{p,\lambda}^V$ es igual a $q_{p,\lambda}^0$. De lo contrario, se debe calcular empleando la Ecuación (6.11). El valor de este parámetro depende principalmente de factores geométricos, paso óptico, distancia entre la lámpara y la celda, entre otras.

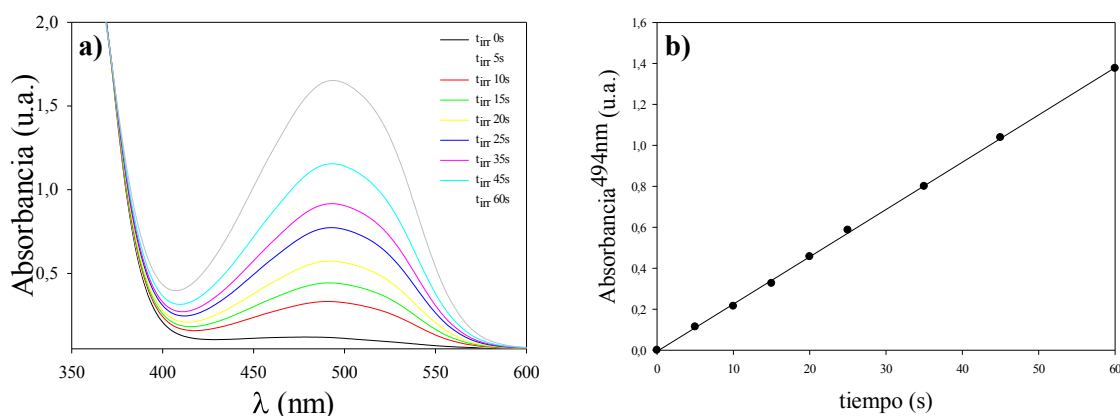


Figura 6.4. (a) Evolución de los espectros de una solución de Abercrome 540 irradiada con una lámpara Rayonet RPR 3500 A; (b) Variación de la absorbancia a 494nm en función del tiempo de irradiación.

Bibliografía

1. Ruppen, H. A. G. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5445–5451 (2007).
2. Lakowicz, J. R. . *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; (2006).
3. Seigel, H. O. *Contents 2*. (1979).
4. Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 167–173 (2004).
5. Braslavsky, S. E. . ; *Pure Appl. Chem.* **79**, 293–465 (2007).
6. Guidi, G.; Giuffrida, S.; Condorelli, G.; Constanzo, L. L.; Miano, P.; Sortino, S. . ; *Photochem. Photobiol.* **63**, 455–462 (1996).
7. Denofrio, M. P.; Ogilby, P. R.; Thomas, H. & Lorente, C. ; *Photobiol. Sci.* **13**, 1058–1065 (2014).
8. McCord, J. M; Fridovich, I. ; *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055 (1969).
9. Ogilby, P. R. and Foote, C. S. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3423–3430 (1983).
10. Foote, C. S.; Clennan, E. L.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F. . in *Active Oxygen in Chemistry* 105–140 (1995).
11. Martinez, L. A.; Martinez, C. G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 94–107 (2000).
12. Salomaa, P.; Schaleger, L. L.; Lo9ng, F. A. ; *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1–7 (1964).
13. Bourdelande, J.; Nonell, S.; Acuña, A.; Sastre, R. . in *Glosario de terminos usados en fotoquímica*; (1999).

Capítulo 7: Técnicas Analíticas y Espectroscópicas

En este capítulo se describen las técnicas empleadas para estudiar los procesos fotoquímicos: i) Espectrofotometría UV-Vis; ii) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); acoplada a un detector de arreglo de diodos (PDA) y un detector de fluorescencia (FL); iii) Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas; iv) Estudios de fluorescencia en estado estacionario; v) Determinación colorimétrica de H_2O_2 ; vi) Medida de oxígeno disuelto.

Por otra parte, se realizaron pruebas para estudiar la interacción de los estados excitados con los sustratos. Para esto se utilizaron técnicas espectroscópicas avanzadas, tales como espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo y espectroscopia de absorción triplete-triplete por fotólisis de destello laser (Laser Flash Photolysis (LFP)).

Estas técnicas se utilizaron para la identificación, caracterización y cuantificación de reactivos y productos de la reacción, y para dilucidar los mecanismos de reacción.

7.1 Análisis de soluciones irradiadas

7.1.1 Espectrofotometría UV-Vis

Esta técnica está basada en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra, en función de la longitud de onda. El resultado es una variedad de bandas que dan información energética de los estados electrónicos de la molécula en estudio. Si bien los espectros de absorción no dan información detallada sobre la estructura química de los compuestos presentes en una muestra, son muy útiles para observar cambios en los grupos funcionales.

En este trabajo de tesis, los espectros de absorción fueron obtenidos con los siguientes espectrofotómetros: UV-1800 (*Shimadzu*) y S2000 (*Ocean Optics*). Estos equipos permiten medir el espectro en un rango de longitudes de onda de 190 a 900nm. El equipo *Shimadzu* es un espectrofotómetro de barrido de doble haz, con alta sensibilidad, mientras que el otro equipo es de simple haz y tiene un detector de arreglo de diodos, lo que lo hace menos sensible y preciso, pero más rápido que el primer espectrofotómetro. Ambos tienen software que permiten el registro y almacenamiento de datos.

Los espectros se realizaron tomando como blanco H_2O . Para las medidas, se utilizaron celdas de cuarzo (*Hellma*) de camino óptico 1cm ó 0,4cm, dependiendo del análisis que se realizara.

Durante las irradiaciones se registraron los espectros de absorción a diferentes tiempos, para observar si existía un cambio espectral, debido a la reacción. En un caso particular, como lo son las reacciones fotosensibilizadas, si se observaban cambios espectrales en la región donde absorbe el sustrato, se podría suponer que efectivamente está ocurriendo un cambio debido a una reacción fotosensibilizada, en donde el sustrato está siendo modificado fotoquímicamente. Los gráficos obtenidos en esta técnica permiten evaluar diferentes aspectos, tales como los procesos cinéticos.

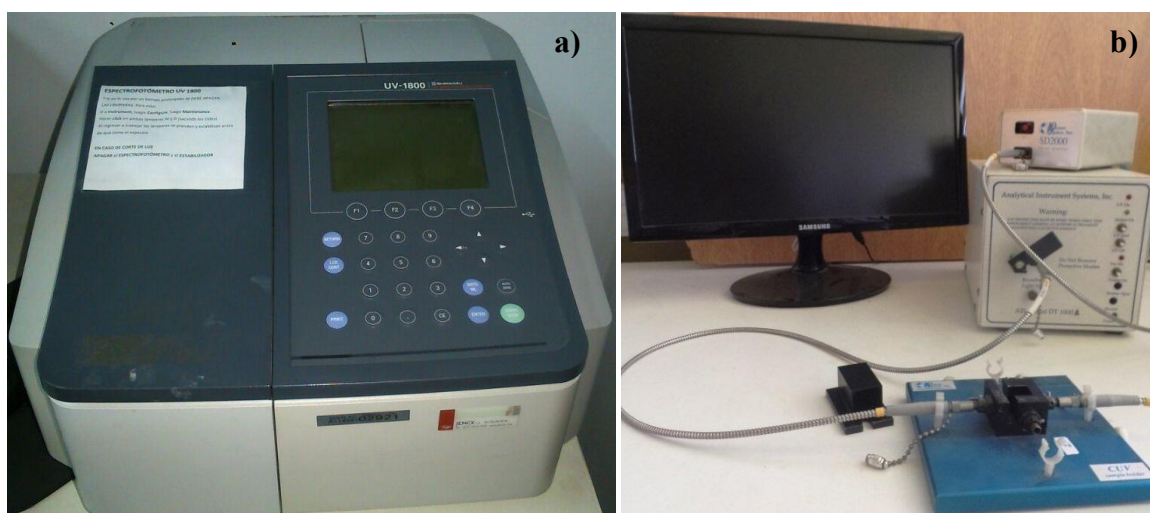


Figura 7.1. Fotografía de los espectrofotómetros utilizados (a) equipo *Shimadzu* (b) equipo *Ocean Optics*

7.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria.

Esta técnica se utilizó para la separación de los componentes, presentes en la mezcla, basándose en distintos tipos de interacciones, tanto físicas como químicas, generadas entre la sustancia analizada y la columna cromatográfica. Además de utilizarse para la separación de los componentes, también fue usada como criterio de pureza e identificación de los compuestos.

Brevemente, la muestra atraviesa la columna cromatográfica (fase estacionaria) mediante el bombeo del solvente (fase móvil). En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la fase estacionaria está compuesta por pequeñas partículas con ciertas características en la superficie, las cuales están densamente empaquetadas y ofrecen gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo cual es importante tener alta presión para que el solvente fluya a una velocidad adecuada.

Después de introducir la muestra, sus componentes se retrasan diferencialmente, dependiendo de las interacciones con la fase estacionaria a medida que pasan por la columna. Los componentes separados son detectados a la salida de la columna mediante detectores que miden alguna propiedad tal como absorción de luz, fluorescencia, índice de refracción, etc. El tiempo que tarda un componente de la muestra en eluir de la columna es denominado tiempo de retención (t_r), el cual depende de la naturaleza misma del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El resultado final de una corrida por HPLC es un cromatograma, el cual está definido como una gráfica de la señal del detector en función del tiempo de corrida.

El equipo utilizado para realizar las medidas es un equipo *Shimadzu Prominence LC-20A* (Figura 7.2). Este equipo está compuesto por un módulo de distribución de solventes (LC-20AT), un desgasificador en línea (DGU-20A5), un módulo controlador (CBM-20), un inyector programable (SIL-20A HT) y un horno (CTO-10AS-VP). Además, el equipo cuenta con dos sistemas de detección acoplados, uno de ellos es un detector espectrofotométrico UV/Vis (SPD-M20A, *Shimadzu*) (HPLC-PDA), el cual permite hacer una evaluación de la absorbancia en el rango de longitudes de onda entre 200-800nm. El otro es un detector de emisión fluorescente (RF-M20A) (HPLC-FL), el cual tiene la posibilidad de fijar simultáneamente dos longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) en el rango de 300-600nm, con su correspondiente longitudes de onda de emisión (λ_{em}) en el rango de 300-800nm.

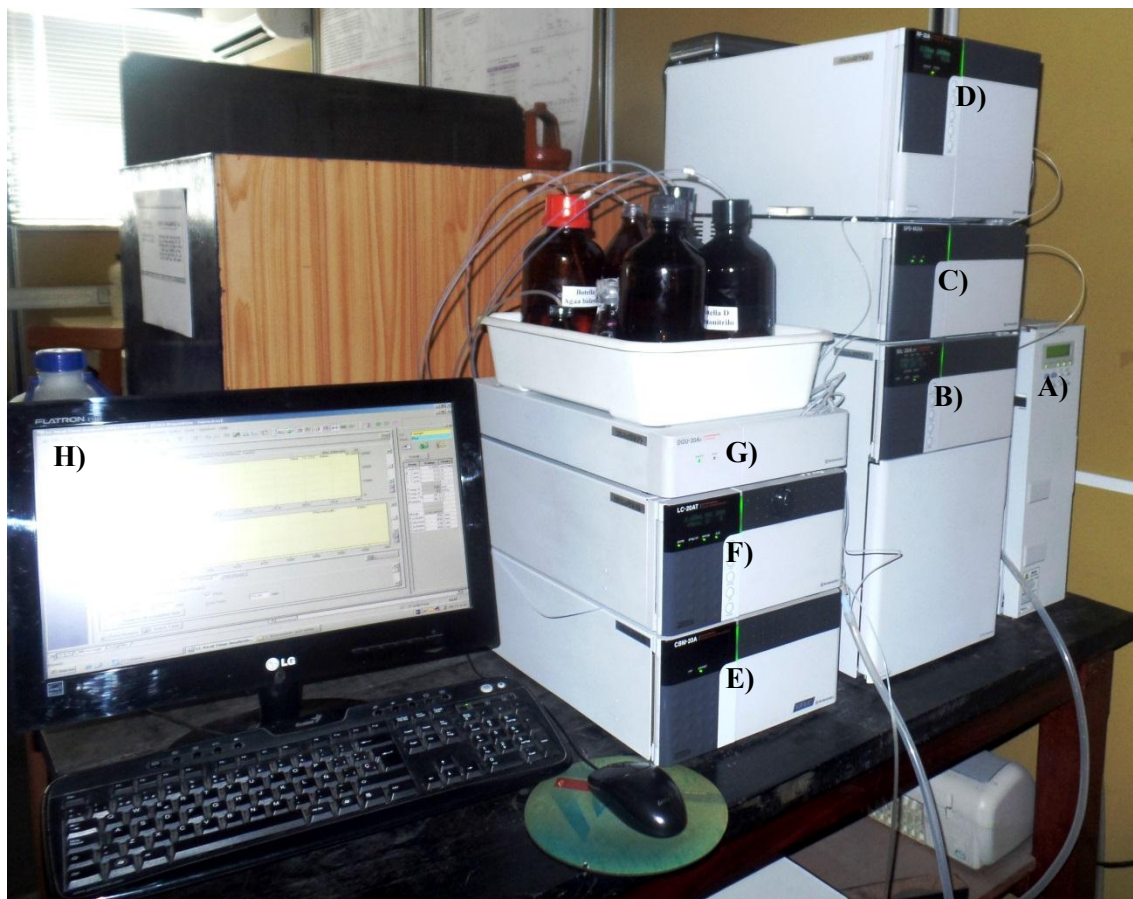


Figura 7.2. Fotografía del equipo Shimadzu Prominence LC-20A: (A) horno y columna; (B) Inyector programable; (C) Detector UV-Vis (PDA); (D) Detector de fluorescencia (FL); (E) Módulo controlador; (F) Modulo de distribución de solvente; (G) Desgasificador; (H) Computador y software.

El equipo posee un programa para la recolección de los datos (*LC Solution*) que permite, además de registrar y evaluar las señales provenientes de ambos detectores. Para realizar las curvas de calibración para calcular la concentración correspondiente a los picos cromatográficos automáticamente.

Se utilizaron dos columnas diferentes de fase reversa:

- ✓ Columna Synergi 4 μm POLAR-RP 80A (150 x 4.6 mm, 4 μm , Phenomenex): La fase estacionaria C18, posee grupos fenilo unidos con una función éter a las partículas con protección hidrofílica diseñada para maximizar la retención y la selectividad de los analitos polares y aromáticos. Su principal ventaja reside en que es una columna muy estable para realizar corridas en las cuales la fase móvil tiene un alto porcentaje de fase acuosa.

- ✓ Columna Jupiter 4 μm Proteo 90A (150 x 4.6 mm, 4 mm, Phenomenex): Posee una fase estacionaria de sílice de alta superficie, lo que proporciona alta eficiencia y una fase C12 ligada, que permite una excelente sensibilidad. Su principal ventaja se encuentra en que es una columna con mayor capacidad de pico y resolución para la separación de péptidos y proteínas, en mezclas acuosas y orgánicas.

Como fase móvil, se utilizaron, en todos los casos mezclas de solución acuosa de AcNH_4 (10 mM, pH 7,0) y acetonitrilo. La proporción de ambos solventes depende de los componentes a analizar y se presenta en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Composición de las mezclas utilizadas como fase móvil para los diferentes experimentos realizados

	% Fase acuosa: AcNH_4 10mM (pH 7)	% Fase orgánica: Acetonitrilo	Flujo (ml/min)
Fase móvil I	100	0	0.6
Fase móvil II	98	2	0.6
Fase móvil III	89	11	1
Fase móvil IV	83	17	1
Fase móvil V	80	20	1
Fase móvil VI	75	25	1
Fase móvil VII	77	23	1

En el caso de la cuantificación de compuestos separados por HPLC, se realizaron curvas de calibración empleando soluciones patrón. Para un determinado compuesto se preparó una solución madre y luego se realizaron diluciones, que fueron inyectadas en el cromatógrafo. Al obtener los cromatogramas se integraron las áreas bajo la curva y se graficaron en función de la concentración y se calcularon las correspondientes pendientes que sirven como factor de conversión para calcular las concentraciones en las muestras.

7.1.3 Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una muestra en función de su masa. El espectrómetro

de masas es un equipo que ioniza las moléculas de una muestra y luego separa los iones mediante un campo eléctrico y/o magnético en función de su relación masa/carga (m/z). Cuando el haz de iones alcanza el detector, se forman patrones específicos, que permiten caracterizar los compuestos que se están analizando. La cámara o fuente de ionización es la parte del equipo que convierte los componentes de la muestra en iones, obteniéndose así un haz de iones positivos ó negativos, que posteriormente se acelera hacia el interior del sistema de separación. El tipo de técnica utilizada para este trabajo fue ionización por electrospray (ESI) (Figura 7.3). En esta técnica se produce una fina niebla de gotas de elevada carga y la evaporación del solvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la fase gaseosa.

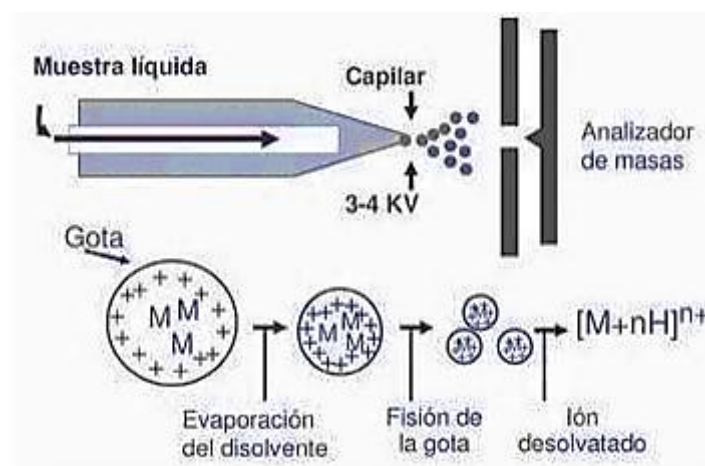


Figura 7.3. Esquema de un sistema de ionización ESI: electrospray

Las fuerzas del campo eléctrico en las gotas cargadas alcanzan un punto crítico en el cual es cinética y energéticamente posible el paso a fase gaseosa para los iones de la superficie. En este momento, la tensión superficial no es capaz de mantener la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una explosión Coulómbica y la gota se rompe en gotas más pequeñas y menos cargadas. El proceso de disminución de volumen puede repetirse hasta que existan moléculas de analito, las cuales formen iones individuales cargados. De esta forma, la transferencia de las especies iónicas desde una solución a la fase gaseosa por medio de ESI implica tres etapas principales: (i) Dispersión de un spray fino de gotas cargadas; (ii) evaporación del solvente; (iii) liberación de los iones de las gotas altamente cargadas (Figura 7.3).

Posteriormente, los iones pasan a través de un analizador de masas, donde su trayectoria o velocidad son afectadas mediante un campo eléctrico o magnético. El más utilizado,

es el denominado cuádruplo, el cual está provisto por cuatro barras alargadas formando un cuadrado, conectadas eléctricamente entre pares opuestos (polo positivo y negativo), los cuales sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente se aceleran por un potencial determinado, para luego ser introducidos en el espacio entre las barras. Esta corriente alterna, lleva a los iones dentro de un intervalo limitado de valores m/z , circulando en una trayectoria recta para llegar finalmente al detector.

Otro tipo de analizador es el de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*), en donde la separación es generada fundamentalmente por las distintas velocidades de vuelo de los iones y el tiempo que tarda en llegar al detector. Un potencial determinado se aplica a lo largo de toda la fuente hacia la zona libre de campo. Los iones analizados por esta técnica, dependerán solo de la masa y de la carga producida en el ion. Descartando el tiempo de extracción de la fuente, se puede definir la siguiente expresión para el análisis por esta técnica:

$$\frac{m_i}{z_i} = 2eEl_s \left(\frac{t_i}{l_d} \right)^2 \quad (1)$$

donde m_i es la masa del ion del analito, z_i es la carga del ion del analito, E es el campo de extracción, t_i es el tiempo de vuelo del ion, l_s es la longitud de la fuente, l_d es la región de campo magnético y e es la carga electrónica. Finalmente, el detector registra la carga producida cuando el ion pasa cerca o golpea la superficie. Generalmente se utiliza un cierto tipo de multiplicador de electrones.

En este trabajo se utilizó un espectrómetro de masas en tándem (uso de una segunda etapa de análisis de masas en el mismo experimento), acoplado a un equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*). El equipo utilizado consta de un espectrómetro de masas XevoG2QTof (Waters), acoplado a un cromatógrafo UPLC (Waters) (Figura 7.4). La ionización ESI fue utilizada en ambos modos (ESI^+ y ESI^-). Los voltajes del capilar, cono y lentes fueron de 35 kV, 40 V y 50 V, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C y la de desolvatación fue de 150 °C. El analizador cuádruplo (MS_1) posee una alta resolución y estabilidad, más pre-filtros para maximizar la resolución y la transmisión, mientras que previene la contaminación. El analizador de masas, TOF (MS_2) de alto rendimiento, por su parte, es capaz de detectar un valor de m/z con incertidumbre en el 4 decimal. Los datos se adquirieron y analizaron con el programa Masslynx 4.1 (Waters).



Figura 7.4. Fotografía del espectrómetro de masas XevoG2QTof (Waters), acoplado a un cromatógrafo UPLC (Waters).

Se utilizaron dos columnas para las medidas, la primera es una Columna XBridge C18 3.5 μm (2.1 x 150 mm, Waters) para el análisis de los aminoácidos libres. En el caso del análisis de los péptidos se utilizó una Columna Jupiter 4 μm Proteo 90A (150 x 4.6 mm, 4 mm, Phenomenex). La fase móvil utilizada se presenta en la Tabla 7.1.

La técnica de UPLC utiliza una nueva tecnología de partículas para cromatografía líquida, un diseño de columnas, inyector, bombas y detectores capaces de trabajar a muy alta presión. Este equipo, además de los detectores MS en tándem, posee un detector UV-Vis acoplado, que trabaja a una longitud de onda fija. Los resultados obtenidos, pueden representarse con cromatogramas de la intensidad de la señal detectada, para un valor fijo de m/z , en función del tiempo de corrida en el equipo. Esta intensidad se relaciona directamente con la cantidad de analito en la muestra.

7.1.4 Emisión fluorescente en estado estacionario

Generalmente las especies estudiadas poseen un estado fundamental electrónico o estado estacionario de interés, y un estado electrónico excitado de una energía superior. Las especies son excitadas mediante la absorción de un fotón, desde su estado electrónico fundamental, a uno de los diversos estados vibracionales en el estado

electrónico excitado. Desde este estado, puede tomar diversos caminos para volver a su estado fundamental, entre los cuales está la emisión fluorescente (Capítulo 1).

Un espectro de emisión es un registro de la intensidad de la emisión en función de la longitud de onda y depende de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma se disuelve¹. Estos espectros dan información de los niveles de energía de los orbitales de las moléculas, y permiten estimar la diferencia de energía entre los estados electrónicos involucrados en una transición.

7.1.4.1 Descripción del equipo

Para obtener los espectros de emisión se utilizó un equipo Single-Photon-Counting FL3 TCSPC-SP (HoribaJobinYvon) (Figura 7.5(a)). Este equipo modular con configuración en forma “X” (Figura 7.5) emplea la técnica recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (TCSPC, por su nombre en inglés *Time-Correlated Sinlge Photon Counting*). A continuación se listan los componentes más relevantes del equipo (Figura 7.5):

✓ **Fuentes de excitación:**

(A-1) Lámpara de Xenón estacionaria (CW 450 W).

(A-2) Lámpara de Xenón pulsada (UV xenón flash tube).

(B) LEDs pulsados (NanoLEDs de 295, 340 y 460 nm y SpectraLED de 370 y 560nm).

✓ **Monocromadores:**

(C) Monocromador de excitación (330 nm blaze grating).

(D) Monocromador de emisión en la región de NIR (100 nm blaze grating).

(E) Monocromador de emisión para el visible (iHR320, con dos redes de difracción, 330 y 500 blaze)

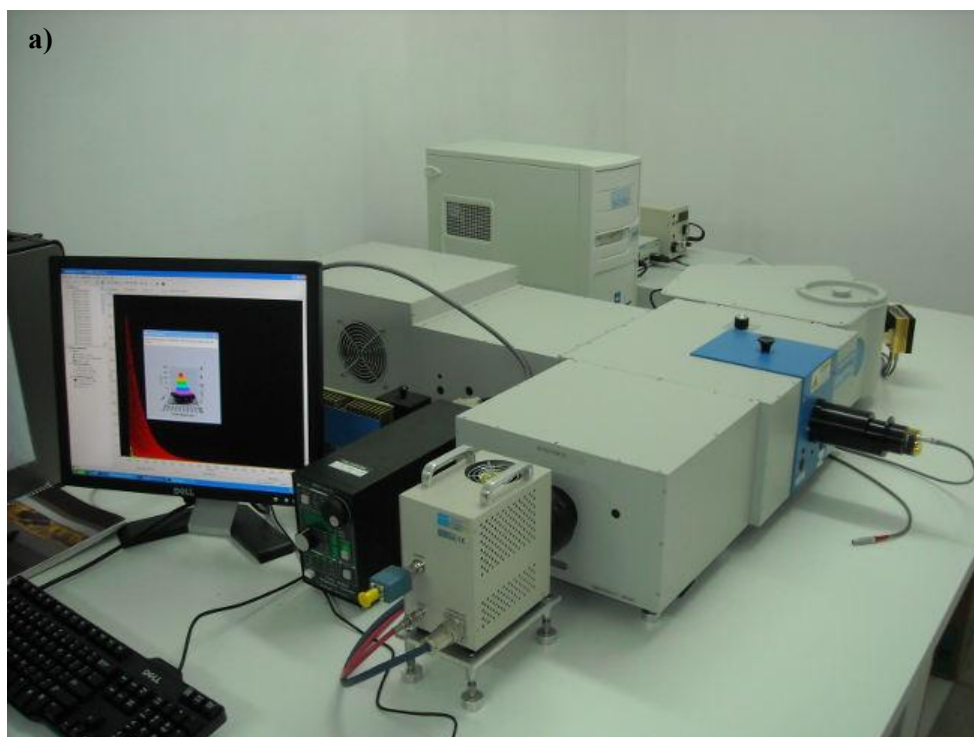
✓ **Detectores:**

(F) Detector diodo de referencia para monitorear la intensidad de la lámpara de Xe luego de pasar por el Monocromador (C).

(G) R-928 para medidas estacionarias en el UV-visible (entre 240-850 nm).

(H) TBX-04 para medidas rápidas en el UV-visible (entre 182-650 nm).

(I) Hamamatsu H10330-45 para realizar medidas en el NIR (entre 950-1700 nm).



b)

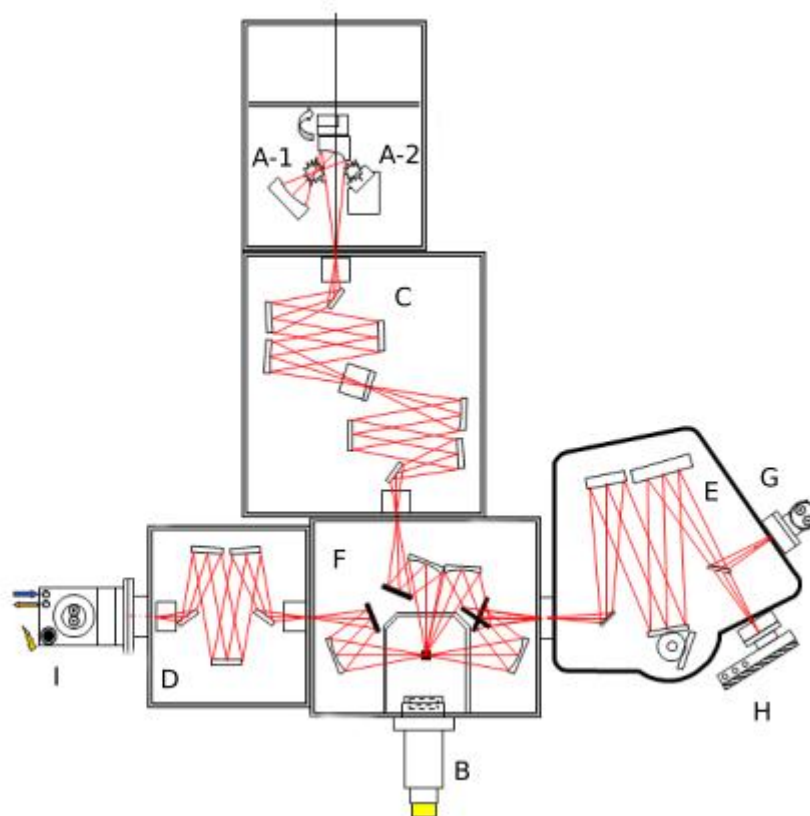


Figura 7.5. (a) Espectrofluorómetro FluoroLog-3, Horiba Jobin Yvon; **(b)** Esquema con la descripción de las partes que componen el espectrofluorómetro (FluoroLog-3, Horiba Yvon). (A-1): Lámpara de Xe estacionaria (CW 450W); (A-2) Lámpara de Xe pulsada; (B) LED; (C) Monocromador de excitación; (D) Monocromador de emisión en la región NIR; (E) Monocromador de emisión en la región UV-Vis; (F) Portaceldas; (G) Detector R-928; (H) Detector TBX-04; (I) Detector Hamamatsu H10330-45

7.1.4.2 Espectros de emisión

La muestra se analizó con el equipo descrito en la *sección 7.1.4.1*, utilizando la fuente de excitación en estado estacionario (A-1) en la región UV-A. La longitud de excitación se selecciona haciendo pasar el haz de luz por un monocromador (Figura 7.5 (b), C), la cual fue elegida dependiendo del análisis que se fuera a realizar. La radiación emitida en forma perpendicular (90°) a la dirección del haz de excitación, es dispersada por un monocromador de emisión (Figura 7.5 (b), E). Después este haz es registrado por el detector (Figura 7.5 (b), G), el cual mide la cantidad de radiación emitida en una determinada longitud de onda de emisión (λ_{em}).

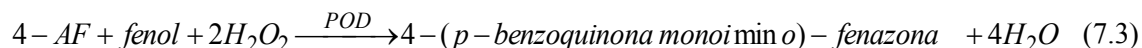
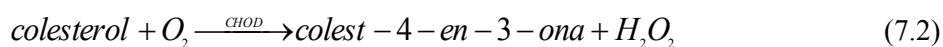
La obtención de un espectro de emisión se realiza excitando en forma estacionaria a la muestra a una determinada λ_{exc} y haciendo un barrido en un rango determinado de λ_{em} .

Los espectros realizados en este trabajo se midieron en fase acuosa, empleando celdas de cuarzo de 1 ó 0.4 cm de camino óptico. Los espectros se corrigieron por las variaciones de la lámpara durante la excitación de la muestra mediante el detector de referencia (Figura 7.5 (b), F) y por la dependencia de la luz transmitida por el monocromador de emisión con λ_{em} (Figura 7.5 (b), E).

7.1.5 Determinación colorimétrica de H_2O_2

Uno de los métodos más utilizados y difundidos para la determinación de colesterol, se basa en un conjunto de reacciones (Reacciones (7.1)-(7.3)), en el cual el colesterol se libera de sus ésteres y luego se oxida para dar una cetona y H_2O_2 . Luego se hace reaccionar con 4-aminofenazona (4-AF) y fenol para dar una quinona coloreada que puede cuantificarse por espectrofotometría a 505nm.

Para la generación de este compuesto se utilizó un kit comercial “COLESTAT” enzimático provisto por laboratorios Wiener (Argentina)



Esta última reacción se utiliza para medir la generación de H_2O_2 en solución. Por lo tanto, se modificó el método de determinación de colesterol para la cuantificación de H_2O_2 generada en los procesos fotoquímicos estudiados, agregando el reactivo comercial a la muestra que contiene H_2O_2 y la cantidad de quinona coloreada se compara con la curva de calibración. Las otras dos enzimas no interfieren dado que son específicas para los sustratos que se indican. Es importante aclarar que se realizaron controles aplicando este método a soluciones no irradiadas de pterinas para descartar la existencia de reacciones inespecíficas.

El reactivo para la determinación de H_2O_2 , se prepara poniendo 50 partes de agua milli Q, 5 partes del reactivo 4-aminofenazona (4-AF) y 5 partes del reactivo fenol, llevando esta solución a 100 partes con agua. Después de esto se adiciona a la mezcla 2 partes de la enzima, previamente homogenizada por inversión (sin agitar la enzima, para evitar la formación de espuma). Las cantidades y concentraciones de los componentes son los siguientes: 1.25 mM de 4-AF, 2.75 mM fenol, lipasa ≥ 6000 U/ l, CHOD ≥ 60 U/ l, POD ≥ 400 , pH 7.4 ± 0.1 . Se puede guardar la solución en frascos de vidrio, preferiblemente oscuros y debe conservarse en un ambiente de baja temperatura ($2-10^\circ\text{C}$), además puede permanecer estable aproximadamente por 1 mes

Para el análisis con las muestras fotolizadas, se manejaron distintos volúmenes de la solución de COLESTAT, dependiendo de la cantidad de H_2O_2 que se sospeche se genera en la muestra. Por lo general, se utilizaron 0.5 ml de muestra irradiada y 0.6ml del reactivo. Después de adicionar la muestra al reactivo color, se deja por 30 min a temperatura ambiente y después se miden las absorbancias a 505 nm de las soluciones. Estos valores, como también los obtenidos para las soluciones de H_2O_2 preparadas para realizar la curva de calibración, fueron corregidos por el valor de la absorbancia a la misma longitud de onda del blanco de reacción, el cual se preparó mezclando el reactivo colorimétrico con la solución de pterina antes del inicio del experimento (respetando en todos los casos las proporciones de la solución y del reactivo color).

7.1.6 Medida electroquímica de oxígeno disuelto

La concentración de O_2 disuelto en las soluciones irradiadas se determinó por un método electroquímico empleando un electrodo sensible de O_2 (Oxímetro YSI Pro20). Para realizar estas medidas se utilizó una celda de vidrio pyrex provista de un cierre hidráulico dentro de la cual se pone la solución a analizar y el electrodo. Dentro de la

celda se coloca un agitador magnético, el cual permite una homogenización de la solución durante todo el experimento. Este equipo permite irradiar y al mismo tiempo realizar la cuantificación de O_2 en la mezcla durante el tiempo que dura la exposición. Además, la membrana del electrodo está protegida de la luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico (Figura 7.6). La solubilidad de O_2 en agua tiene una gran dependencia con la temperatura. Por lo tanto en todos los experimentos se utilizó un termostato (LAUDA Alpha RA8), el cual estaba conectado a la celda, de esta forma se estabilizó la temperatura en 23 °C durante todo el experimento.



Figura 7.6. Equipamiento utilizado para la medida electroquímica de O_2

Es importante aclarar que previo a la irradiación de la solución se realizan todos los controles necesarios, tales como la determinación de la concentración inicial de O_2 en solución. Finalmente, se comienza la irradiación estacionaria, registrándose la concentración de O_2 en tiempo de irradiación. Las condiciones y geometría de estos experimentos fueron diferentes a las realizadas en las celdas de cuarzo, por lo tanto no pueden ser comparados cuantitativamente.

7.2 Técnicas Espectroscópicas avanzadas

7.2.1 Emisión con resolución temporal

En esta técnica se genera cierta población de moléculas en estados excitados mediante un pulso de radiación electromagnética. Después de dicho pulso se registra la emisión

como una función del tiempo. El decaimiento de la fluorescencia es muy rápido, lo cual depende del tiempo de vida del estado excitado singlete, τ_F . Para medir este parámetro se excita la muestra con un pulso de luz muy corto con una λ apropiada y se registra el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo.

Este pulso de luz lleva a las moléculas a un estado electrónicamente excitado (N^*). La velocidad de decaimiento de N^* puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{\partial(N^*)}{\partial t} = -k_F N^* \quad (7.4)$$

Donde k_F es la constante de velocidad de emisión espontánea y corresponde a la sumatoria de todas las vías de desactivación del estado singlete (Capítulo 1). Integrando esta ecuación entre cero y un tiempo “t” se obtiene la siguiente expresión:

$$N_t^* = N_0^* \exp(-k_F \times t) \quad (7.5)$$

Donde N_t^* y N_0^* son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo “t” ó cero respectivamente. Como la intensidad de fluorescencia es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, el τ_F se define como el tiempo requerido para que la intensidad de fluorescencia disminuya en un factor de 1/e de su valor inicial. Lo que conlleva a la siguiente ecuación:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (7.6)$$

Para el cálculo de este parámetro se utilizó como fuente de excitación Nano Leds con un máximo de emisión 295 y 341 nm dependiendo de la muestra que se quisiera analizar. Los fotones emitidos pasan a través de un detector fijo (Figura 7.5 (b), (E)) en 450 nm y se registran finalmente en el detector (Figura 7.4(b), (H)), trabajando en el modo TCSPC.

El principio de esta técnica es la detección de fotones individuales y la medida de los tiempos de llegada al detector en comparación con la señal de referencia. TCSPC es un método estadístico, el cual necesita una fuente de luz pulsada con alta tasa de repetición (LED), el cual acumula un número suficiente de fotones para una precisión estadística. El tiempo de medida está representado por un aumento de un valor de memoria en un histograma en el que los canales en el eje “x” representa el tiempo. El histograma,

cuentas vs canales representarán la intensidad de fluorescencia en función del tiempo (Figura 7.7). La llegada de cada uno de los fotones emitidos se correlaciona con referencia al evento de excitación por un convertidor de tiempo-amplitud, que en esencia convierte la señal en voltaje. Luego un analizador multicanal almacena la señal y construye un histograma de la distribución de los fotones en el tiempo, lo cual es equivalente al decaimiento de la fluorescencia.

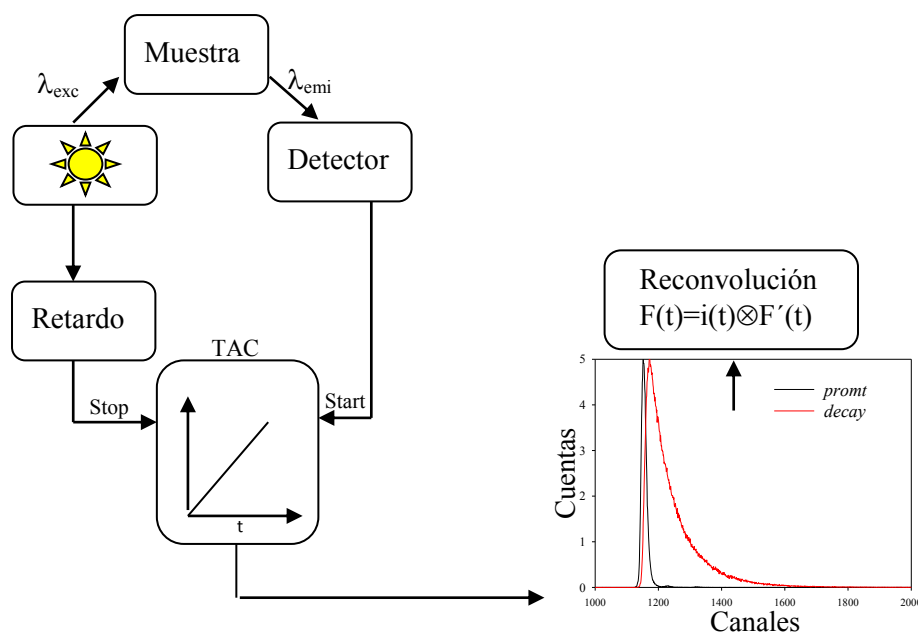


Figura 7.7 Esquema de TCSPC funcionando en modo reverso

Después de generada la señal de cuentas en función del tiempo, es necesario obtener la respuesta temporal del instrumento para la determinación de los parámetros cinéticos a partir de los decaimientos. Esto es obtenido registrando un perfil temporal de la fuente de excitación (*prompt*). Para esto se utilizó una solución que dispersa la luz y además, colocando el monocromador de emisión a la misma longitud de onda de la fuente de excitación y manteniendo el resto de parámetros similares a los de la muestra medida. El programa utilizado para el análisis global de la matriz de datos obtenida es DAS6. Este software combina datos de la muestra y el *prompt* ($F(t)$ y $P(t)$) y mediante un método estadístico de convolución de mínimos cuadrados calcula una función $i(t)$, la cual ajusta mejor los datos del decaimiento de la señal, $F(t)$ aplicando la Ecuación (7.7), donde \otimes representa la convolución entre las funciones $P(t)$ y $i(t)$.

$$F(t) = P(t) \otimes i(t) \quad (7.7)$$

En el caso la fluorescencia de una única especie emisora $i(t)$ será monoexponencial (Ecuación 7.5). El programa permite el uso de funciones multiexponenciales de hasta cinco componentes.

7.2.2 Laser Flash Fotólisis (LFP)

LFP es una técnica con resolución temporal para realizar estudios espectroscópicos y cinéticos donde se emplea una luz pulsada para generar especies transitorias. Por lo general se utiliza un pulso de corta duración para generar este tipo de especie(es) con una concentración adecuada para poder observarla espectroscópicamente². La metodología consiste en someter a la solución o compuesto a un corto e intenso flash de luz lo que lleva a la formación de moléculas excitadas y/o radicales libres con una concentración relativamente alta. Estas especies, producidas transitoriamente, son detectadas por espectroscopía de absorción o de emisión, lo que permite observar el cambio de las mismas en el tiempo.

En las distintas etapas que tienen lugar los experimentos de fotólisis de destello láser se observan transiciones entre los estados excitados (Figura 7.8(a)). Brevemente, la primera etapa tiene la molécula en el estado fundamental con una configuración electrónica propia de este estado (S_0). Después de excitar la molécula por el pulso del láser se genera una alta población de especies en estado excitado singlete. (S_1) y, consecuentemente, tiene lugar un entrecruzamiento de sistemas (ISC). En esta última etapa se generan estados excitados tripletes (T_1). De la misma forma, las moléculas en este estado T_1 muestran un espectro de absorción ($T_1 \rightarrow T_n$) diferente al mostrado por las moléculas en estado fundamental ($S_0 \rightarrow S_1$). Cuando el láser dispara en el tiempo cero ($t = 0$) se produce un aumento en la absorbancia de la muestra, como consecuencia, de esto la intensidad que llega al detector disminuye. Los sistemas de fotólisis son normalmente espectrómetros de un solo haz, pero de hecho se comportan como instrumentos de doble haz. El haz de referencia se separa del haz de la muestra en el tiempo, en lugar de espacio. De este modo, la señal de referencia se obtiene antes de la excitación con el láser y conduce al valor de P_0 . La absorbancia en el tiempo (t) luego del pulso del láser, en la Figura 7.8 (b) está dada por la Ecuación (7.8).

$$\Delta A = -\log\left(\frac{P_0}{P_t}\right) \quad (7.8)$$

En un sistema simple, en donde solo se genera el estado triplete, la relación entre ΔA y la concentración está dada por la Ecuación (7.9).

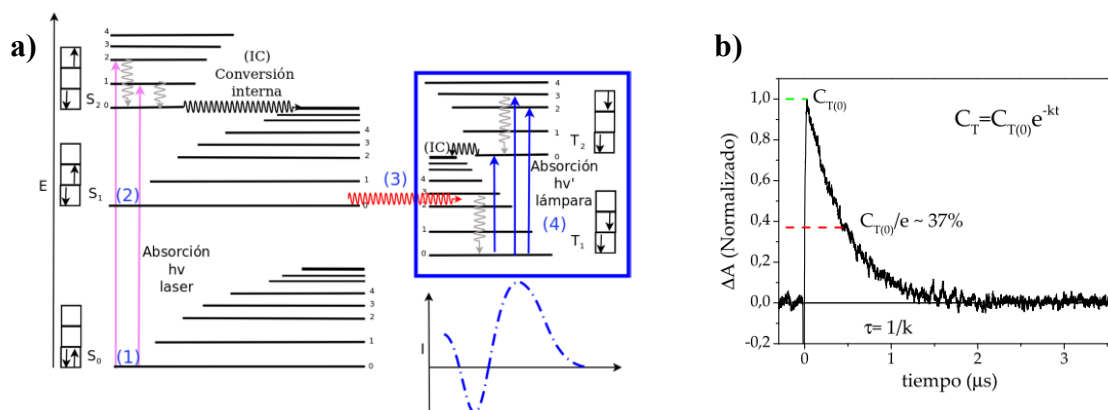


Figura 7.8. (a) Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro azul resalta la transición triplete- triplete que tiene lugar durante los experimentos de fotólisis de destello láser; **(b)** Evolución temporal de ΔA observada en un experimento típico de fotólisis de destello conjuntamente con los parámetros más relevantes de la señal.

$$\Delta A = -\log\left(\frac{P_0}{P_t}\right) = \Delta\epsilon C_{T(t)} l \quad (7.9)$$

Donde $\Delta\epsilon$ es la diferencia entre los coeficientes de absorción de los estados tripletes y fundamental, $C_{T(t)}$ es la concentración del transientes al tiempo “t” y l es el camino óptico. El equipo utilizado para estas determinaciones se presenta en la Figura 7.9, el objetivo principal de estas medias son estudios cinéticos de los estados tripletes del fotosensibilizador.

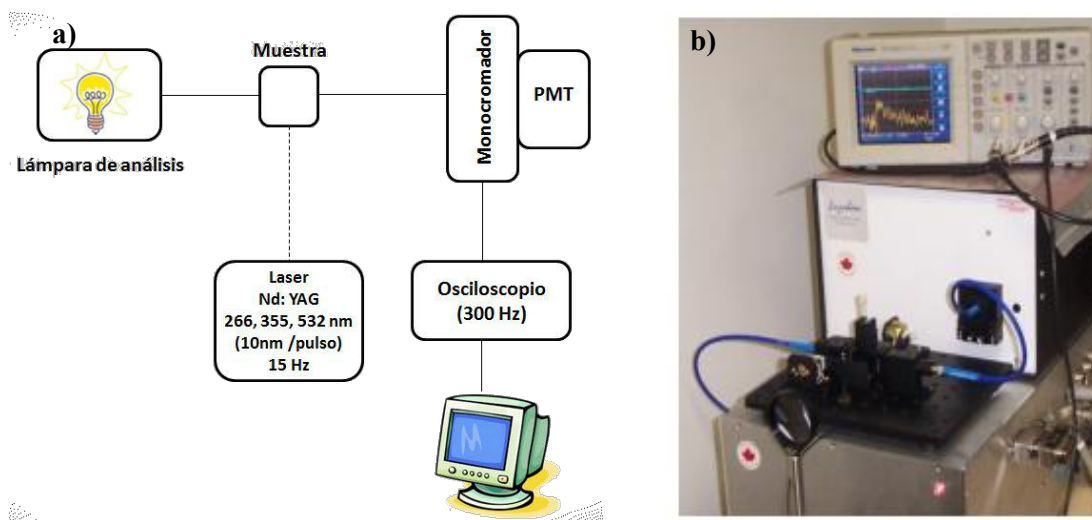


Figura 7.9 (a) Esquema del equipo LFP. **(b)** Fotografía del equipo de fotólisis de destello utilizado en este trabajo.

El equipo (Figura 7.9) consta de un láser Nd:YAG (Minilite II Laser, de continuum Inc), cuyo haz fundamental de 1064 nm se triplica para generar un haz de salida utilizado en todos los experimentos, correspondiente al tercer armónico del mismo (355nm). La duración del pulso generado es de ~10ns y 7mJ por pulso de energía. Para los experimentos se empleó una celda de fluorescencia de cuarzo de 1cm de camino óptico, especial para este tipo de medidas, debido que minimiza el ingreso de O_2 a la solución. La luz de láser y la de análisis se dispone en una geometría de 90° , la luz de análisis de una lámpara de Xe de 150W pasa por la celda y de enfoca en el monocromador (PTI 1695) que está acoplado a fotomultiplicador (1P28 PMT). Las señales se adquieren con el promedio de 5 pulsos, con un osciloscopio digital de 300MHz (Tektronik TDS 3032B) y el resultado se observa en un computador para su análisis.

7.2.2.1 Decaimientos y espectros de especies transitorias

Las soluciones acuosas se prepararon ajustando la absorbancia de la pterina (Ptr) menor a 0.5 a la λ_{exc} . Las condiciones de pH fueron en medio ácido (pH 5.5), se burbujearon las soluciones durante un periodo de 20min. Los controles de los espectros de absorción se realizaron antes y después del disparo del láser, para confirmar que no exista ningún cambio, como puede ser de pH o por degradación de la muestra.

Para el estudio de los procesos de desactivación del estado excitado triplete de la Ptr, se prepararon mezclas que contenían el fotosensibilizador y diferentes concentraciones de aminoácidos en su forma libre (Tyr, His, Met). Una vez que las soluciones se colocaron en la celda, se burbujearon Ar durante 20 min aproximadamente. Los decaimientos fueron registrados luego del disparo del láser a diferentes λ (400-600nm, cada 5-10nm). Para evitar la degradación de la muestra por la irradiación de luz, se agitó entre cada medida o se reemplazó la solución por una nueva alícuota. Las escalas de tiempo utilizadas para analizar las especies transitorias de los estados tripletes formados fueron $0.4\mu s/div$, $1\mu s/div$, $2\mu s/div$ o $4\mu s/div$.

Por otra parte, la construcción de los espectros se realizó registrando las trazas en un rango de λ , y luego de cada señal de decaimiento se extraen los valores de ΔA en una ventana de tiempo dado. De esta manera se obtiene una matriz de datos, en la cual el eje vertical es la intensidad de la señal y los otros dos ejes son el tiempo y longitud de onda.

El equipo automáticamente registra los decaimientos y selecciona las ventanas de tiempo en las que promedia la señal de ΔA a una determinada longitud de onda de análisis, luego automáticamente vuelve a repetir este procedimiento en todas las longitudes de onda en el rango deseado, acumulando así los decaimientos para generar la matriz de datos. Esto conlleva a una mayor acumulación de disparos de láser sobre la misma muestra, como así también mayor exposición a la lámpara de análisis.

Bibliografía

1. Lakowicz, J. R. . *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; (2006).
2. Bourdelande, J.; Nonell, S.; Acuña, A.; Sastre, R. . in *Glosario de terminos usados en fotoquímica*; (1999).
3. Ogilby, P. R. and Foote, C. S. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3423–3430 (1983).
4. Foote, C. S.; Clennan, E. L.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. F. . in *Active Oxygen in Chemistry* 105–140 (1995).
5. Martinez, L. A.; Martinez, C. G.; Klopotek, B. B.; Lang, J.; Neuner, A.; Braun, A. M.; Oliveros, E. . ; *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **58**, 94–107 (2000).

PARTE III

RESULTADOS: DEGRADACIÓN FOTOSENSIBILIZADA DE

AMINOÁCIDOS LIBRES

Capítulo 8: Interacción de los estados excitados de la Ptr con aminoácidos

Para encarar el estudio de los procesos fotosensibilizados por pterina (Ptr) sobre aminoácidos y péptidos, es importante conocer los estados excitados y estudiar su interacción con los sustratos. Cuando las pterinas absorben radiación UV-A se genera un estado electrónicamente excitado singlete, el cual, a su vez, conduce a un estado excitado triplete. Existen diferentes estudios sobre los estados excitados de distintos compuestos pterínicos, principalmente pterinas oxidadas, y sobre su rol en procesos fotosensibilizados (Capítulo 3).

En este capítulo se presentarán los resultados concernientes a la interacción de los estados excitados singletes y tripletes de Ptr con aminoácidos, lo que permitirá obtener información sobre la participación de dichos estados en diferentes reacciones. Como se mencionó anteriormente, el primer estado excitado singlete de Ptr ($^1Ptr^*$) puede estudiarse por fluorescencia, mientras que los estados excitados tripletes ($^3Ptr^*$) se investigan con la técnica *laser flash photolysis* (LFP).

8.1 Interacciones de los estados singlete de Ptr ($^1Ptr^*$) con aminoácidos

Las características fluorescentes (espectro de emisión y excitación, rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y tiempo de vida (τ_F)), de los compuestos pterínicos se describieron en la *Sección 3.2*. La metodología empleada para determinar la interacción de los estados singletes de la Ptr con los aminoácidos fue descrita en el Capítulo 7, utilizando una lámpara de Xe como fuente de excitación en los experimentos de estado estacionario y un NanoLED con emisión a 341 nm en los experimentos resueltos en el tiempo.

Se realizaron experimentos en estado estacionario y resueltos en el tiempo, con el objetivo de estudiar la desactivación del primer estado excitado de la Ptr por diferentes aminoácidos (triptófano (Trp), tirosina (Tyr), histidina (His), metionina (Met)). Los experimentos fueron realizados en solución acuosa, en medio ácido (pH 5,5).

Se obtuvieron los espectros de emisión, de las soluciones en las que estaba presente la Ptr y el aminoácido (Trp, His, Met), excitando a 340 nm y registrando la emisión en el intervalo comprendido entre 400 y 600 nm. Se tomó una serie de espectros de las soluciones que contenían la misma concentración de Ptr (20 μ M) y concentraciones crecientes del aminoácido. Posteriormente, se tomaron los valores en el máximo de

emisión (I_F) a 450nm, teniendo en cuenta que esta longitud de onda no cambia a lo largo del experimento. Es importante aclarar que para las concentraciones que se pueden alcanzar con la Tyr, debido a su solubilidad, el apagamiento de la fluorescencia de Ptr fue despreciable, por lo tanto, en este caso no se realizaron los experimentos de desactivación con esta técnica.

En la Figura 8.1 se presentan los resultados obtenidos para la desactivación de la fluorescencia de Ptr por aminoácidos en estado estacionario. Los gráficos de la Figura 8.1 (a) y (c) muestran que para el Trp y la Met existe una desactivación significativa de la fluorescencia, indicando que el estado excitado singlete de la Ptr ($^1Ptr^*$) es desactivado por ambos aminoácidos, observándose en el caso del Trp un mayor efecto de desactivación. En el caso de la His no se observaron cambios significativos en el espectro de emisión de la Ptr cuando se adicionaba cantidades crecientes del aminoácido (Figura 8.1 (b)).

En los experimentos resueltos en el tiempo se tomaron los tiempos de vida (τ_F) en ausencia del respectivo aminoácido, y se observó un comportamiento mono exponencial con un valor de τ_F para la Ptr de 7,7 ns, lo cual coincide con lo reportado en literatura. A medida que se agrega el desactivador se observaron decaimientos mono exponenciales más rápidos, y por lo tanto una disminución en el τ_F de la Ptr (Figura 8.2). El resultado obtenido a partir del análisis matemático de estas trazas mostró una disminución en función del aumento en la concentración del desactivador. Es importante aclarar que este tipo de experimentos no se realizaron en presencia de His, ya que la desactivación de la fluorescencia, medida en estado estacionario, fue poco significativa, por lo tanto los resultados se presentan utilizando como desactivadores Trp y Met.

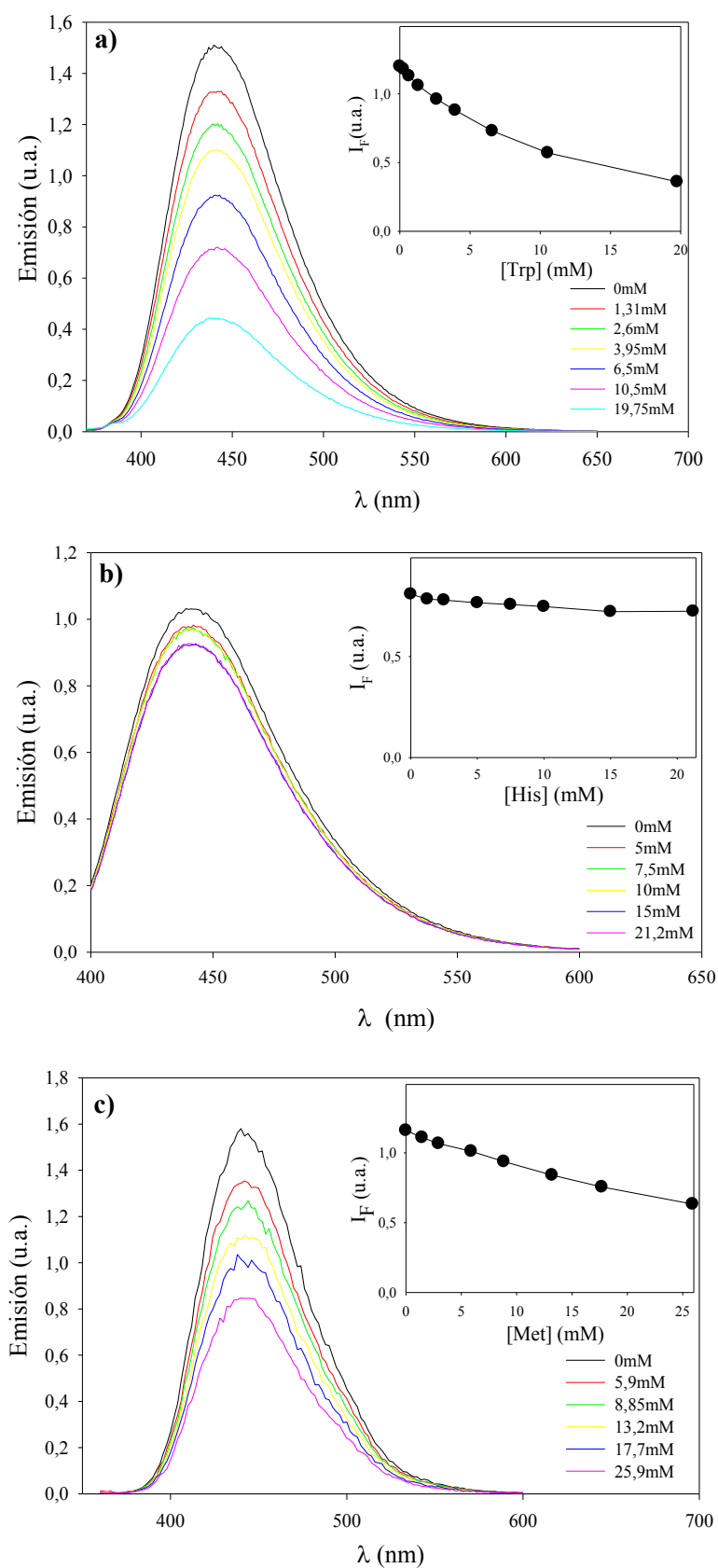


Figura 8.1. Espectros de emisión de soluciones acuosas de Ptr en presencia de aminoácidos. [Ptr] = 20 μ M; pH 5,5; λ_{exc} = 350 nm; l = 1 cm; (a) Trp; (b) His; (c) Met.

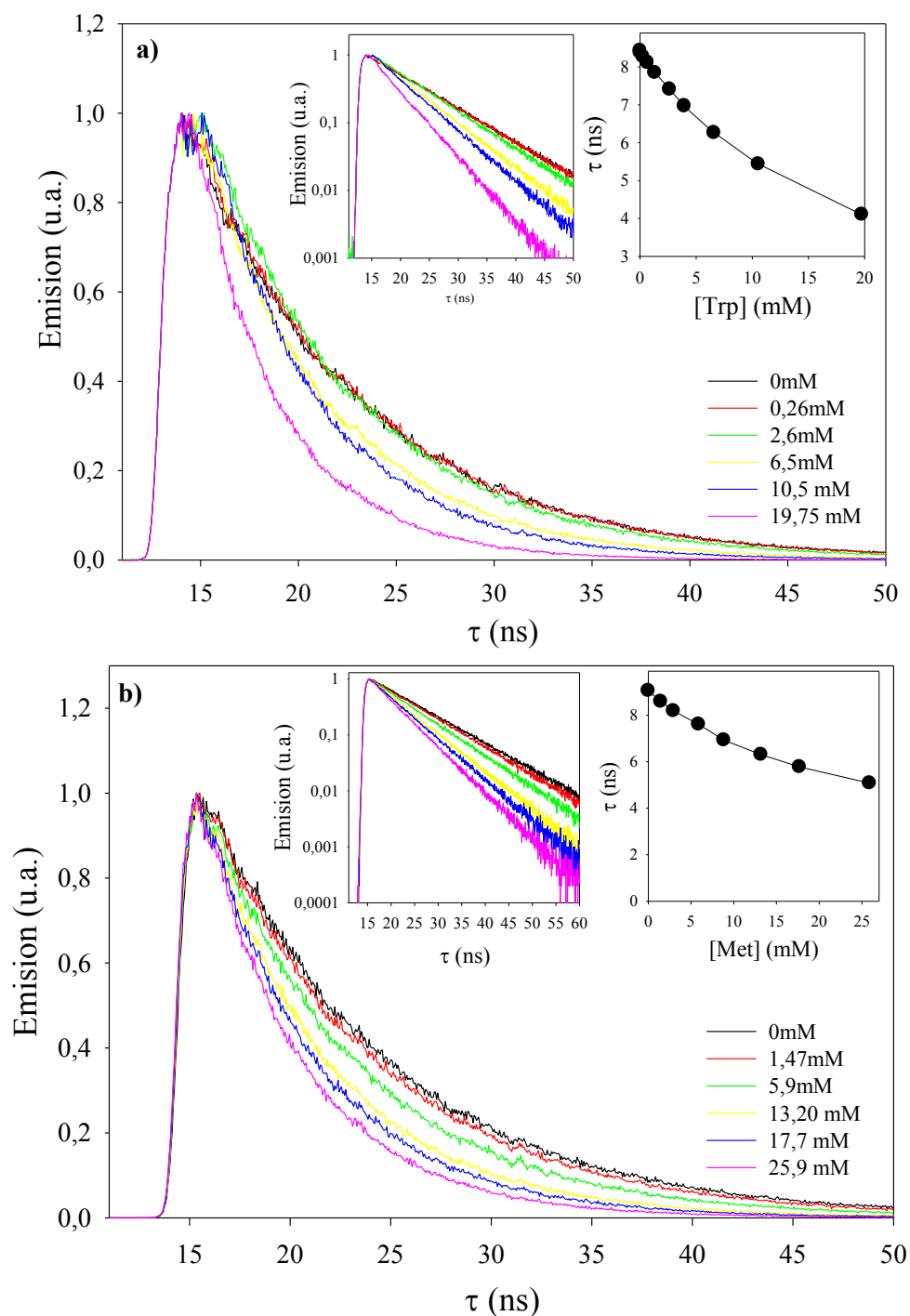


Figura 8.2. Variación de emisión fluorescente en función del tiempo de soluciones de Ptr en presencia de Trp y Met. **(a)** Trp; **(b)** Met. Inset: tiempos de vida de fluorescencia de soluciones de Ptr en función de la concentración de aminoácido. [Ptr] = 20 μ M; pH 5.5; λ_{exc} = 341 nm; l = 1 cm.

Como se mencionó en el Capítulo 1, el fenómeno de *quenching* de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. Este fenómeno puede dividirse en dos grupos: “*quenching colisional o dinámico*”, cuando la desactivación es resultado de los choques entre

moléculas (molécula fluorescente y *quencher*), y “*quenching estático*”, cuando es el resultado de formación de complejos.

La Ecuación de Stern-Volmer para procesos de quenching dinámico, fue deducida en el Capítulo 1, y se define de la siguiente forma:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = \frac{\tau_F^0}{\tau_F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (8.1)$$

Donde I_F^0 e I_F se definen como la intensidad de la fluorescencia en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente; τ_F^0 y τ_F son los tiempos de vida de fluorescencia de la especie emisora en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente; $[Q]$ es la concentración del desactivador; $K_{SV} (=k_q \tau_F^0)$, es la constante de Stern-Volmer y se puede obtener de las gráficas de I_F^0/I_F versus $[Q]$ (gráfica de Stern-Volmer), que en el caso de un *quenching dinámico* debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje I_F^0/I_F . La pendiente de dicha gráfica es K_{SV} ; k_q es la constante biomolecular de desactivación.

Por otra parte, el *quenching estático* se produce, generalmente, como consecuencia de la formación de un complejo no fluorescente entre la molécula emisora y la molécula *quencher*. Como en el *quenching dinámico*, la ecuación también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal, sin embargo, en este caso, K_{SV} es igual a la constante de equilibrio (K_s) para el estado basal del complejo formado. La medida de τ_F a diferentes concentraciones de desactivador es un método conocido para diferenciar entre un *quenching* estático ó dinámico (Capítulo 1).

$$\begin{aligned} \frac{I_F^0}{I_F} &= 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_s[Q] \\ \frac{\tau_F^0}{\tau_F} &= 1 \end{aligned} \quad (8.2)$$

Si ambos procesos, dinámico y estático estuvieran ocurriendo, al graficar $\frac{I_F^0}{I_F}$ vs $[Q]$, se observaría una gráfica cuadrática y la relación matemática sería la siguiente:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_s[Q]) \quad (8.3)$$

Donde K_D y K_s son los valores de las constantes para un *quenching* dinámico y estático respectivamente. Es decir K_D es igual a $k_q \tau_F^0$ y K_s es la contante de equilibrio para la

formación del complejo. Como τ_F solo depende del *quenching* dinámico, K_D puede ser obtenida de la gráfica de $\frac{\tau_F^0}{\tau_F}$ vs $[Q]$.

En la Figura 8.3 se muestran los gráficos de Stern-Volmer para los experimentos en presencia de Ptr y los aminoácidos realizando un ajuste con las Ecuación (8.1) y (8.3). Estos gráficos se obtuvieron tomando el valor de emisión en el máximo (450 nm) y calculando τ_F en presencia y ausencia del desactivador.

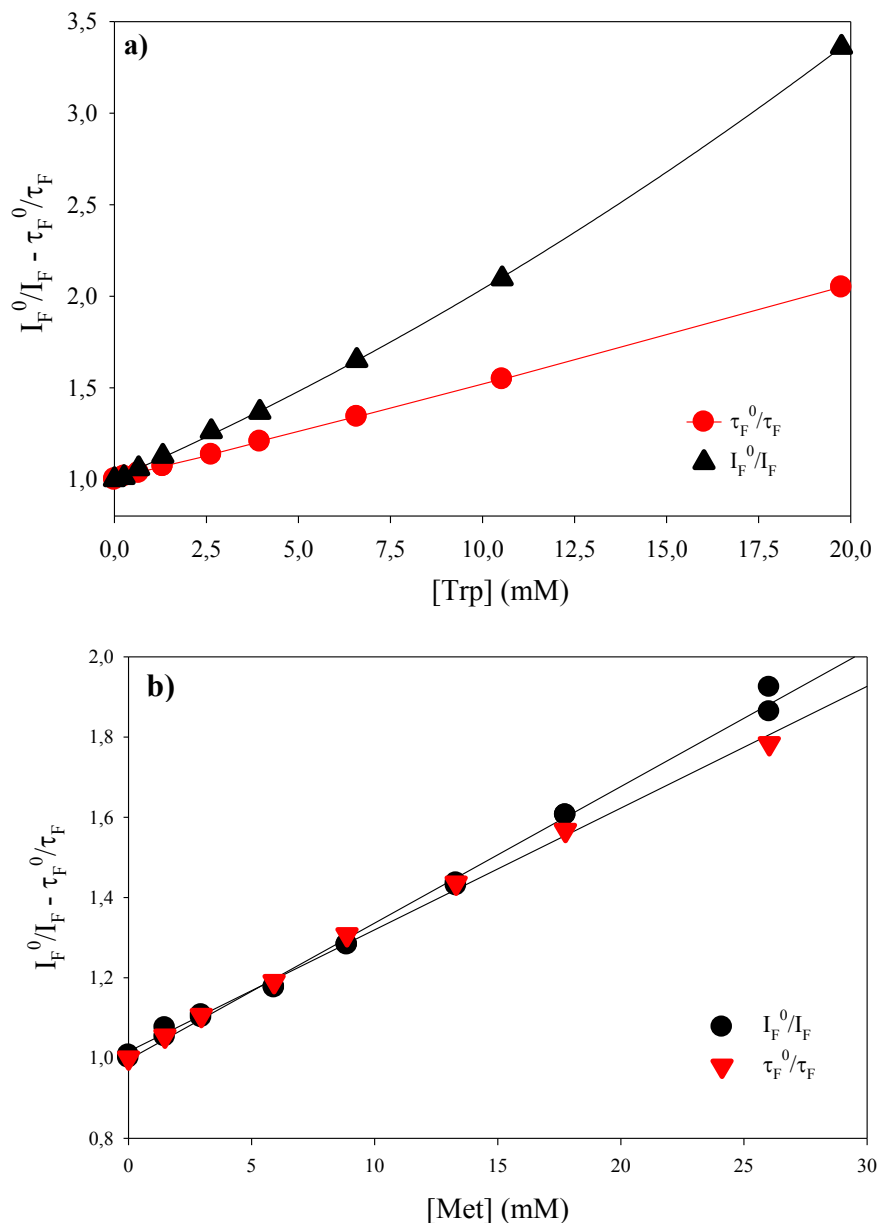


Figura 8.3. Gráficas de Stern-Volmer, I_F^0/I_F y τ_F^0/τ_F . **(a)** Trp; **(b)** Met. $[Ptr] = 20 \mu M$; $\lambda_{exc} = 341 \text{ nm}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$;

En el caso del *quenching* de Ptr por Trp, las medidas en estado estacionario presentan un comportamiento no lineal (Figura 8.3 (a)). En este caso la curva se ajustó con la Ecuación 8.3, sugiriendo que el *quenching* observado es una combinación de los procesos dinámico y estático. Por otra parte, la dependencia de τ_F en la concentración de Trp fue totalmente lineal. Los valores de K_D y K_S se presentan en la Tabla 8.2 los cuales indican que el *quenching* dinámico del estado excitado singlete de la Ptr podría ser influenciado por la naturaleza del aminoácido. Además, demuestra que existe una asociación entre el aminoácido y la Ptr, pero la formación de este complejo podría darse solo a concentraciones altas de los reactivos.

Por otra parte, en los experimentos utilizando Met como desactivador, la relación I_F^0 / I_F en función de la concentración del aminoácido fue lineal (Figura 8.3 (b)), lo que sugiere que no hay contribución estática y que el *quenching* de fluorescencia es puramente dinámico. Además los gráficos resueltos en el tiempo τ_F^0 / τ_F muestran un comportamiento lineal para este desactivador. Los resultados de K_D para la Met en estado estacionario y resuelto en el tiempo revelaron que no existe diferencia significativa en ambos experimentos (Tabla 8.2), siendo ligeramente más bajos que los obtenidos para Trp, esto quiere decir que el *quenching* de fluorescencia de Ptr por Met es ligeramente menos eficiente que el *quenching* por Trp.

Tabla 8.2. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} y K_S)

Desactivador	Resuelto en el tiempo	Estado estacionario		
	$K_{SV} (M^{-1})$	$K_D (M^{-1})$	$K_S (M^{-1})$	$k_q (10^9 M^{-1}s^{-1})$
Triptófano	53 ± 2	62 ± 2	30 ± 2	5,95
Metionina	30 ± 1	34 ± 2	0	3,31

Con los valores de la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) y los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia del desactivador (τ_F^0), se calculó la constante biomolecular de velocidad de *quenching* de fluorescencia (k_q) por los aminoácidos. Para el Trp y Met, el valor de k_q es del orden de 10^9 , confirmando así que estos aminoácidos desactivan en mayor orden el estado excitado singlete Ptr, mientras que la His a altas concentraciones no es un buen desactivador. Es importante aclarar que las concentraciones de los aminoácidos con las que se realizaron los experimentos de *quenching* del estado

singlete, son mayores a las utilizadas en las reacciones fotosensibilizadas presentadas en capítulos posteriores. Por lo tanto, este resultado confirma que en las condiciones en que se realizan los experimentos de fotosensibilización, la desactivación del estado singlete de la Ptr por aminoácidos es despreciable.

8.2 Interacciones de los estados tripletes ($^3Ptr^*$) por aminoácidos

8.2.1 Espectro de absorción de transientes de Ptr

Se realizaron experimentos para determinar el espectro de absorción de transiente de la Ptr. En particular, el espectro de este compuesto pterínico se registró irradiando la solución durante todo el tiempo que dura el experimento sin necesidad de utilizar un sistema de flujo. Aunque la Ptr es fotoquímicamente estable, se realizaron controles para verificar que no existiera un consumo apreciable de la muestra durante el tiempo que dura el experimento, midiendo el espectro de absorción antes y después de la irradiación con el láser y la lámpara.

El espectro que se muestran en la Figura 8.4 se construye a partir de los decaimientos a cada una de las longitudes de onda del compuesto, es decir para la Ptr se registró el espectro entre 400 y 600 nm en un intervalo de 10 nm. Los decaimientos se midieron con una escala de 2 μ s por división (μ s/ div), se calculó el promedio de la señal a cada longitud de onda a 0.09 μ s, 0.20 μ s, 0.75 μ s y 5.71 μ s luego del pulso del láser. Este resultado demuestra que existen especies transitorias con una absorción entre 400 y 600 nm con un máximo intenso en 440 nm aproximadamente. Estos resultados son comparables con resultados previamente presentados para Ptr y otro grupo de pterinas¹.

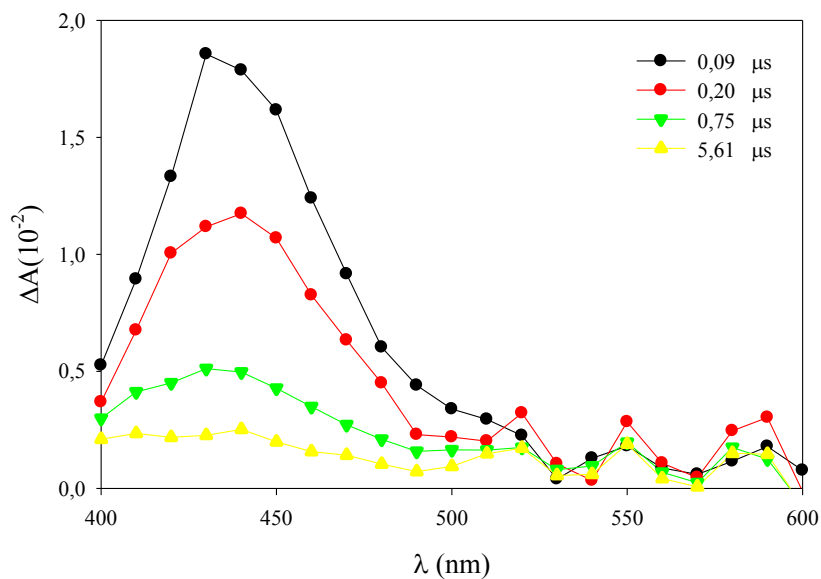


Figura 8.4. Espectro de absorción de transientes de soluciones de Ptr saturadas en Ar, pH 5,5, $\lambda_{exc} = 355$ nm, $A_{355nm} = 0,5$, escala $2 \mu s/div$, $[Ptr] = 100 \mu M$.

Al analizar los decaimientos de los compuestos estudiados, éstos presentan un comportamiento biexponencial en todo el rango del espectro de absorción de transientes. En la Figura 8.5 se presenta el decaimiento a 430 nm de una solución acuosa de Ptr saturadas en Ar a pH 5,5 con el correspondiente ajuste biexponencial. A partir del análisis del decaimiento, se obtuvieron los dos tiempos de vida correspondientes a los componentes de la Ptr, siendo $\tau_{Tc} = 0,34 \mu s (\pm 0,06)$ y $\tau_{TI} = 3,5 \mu s (\pm 0,9)^2$.

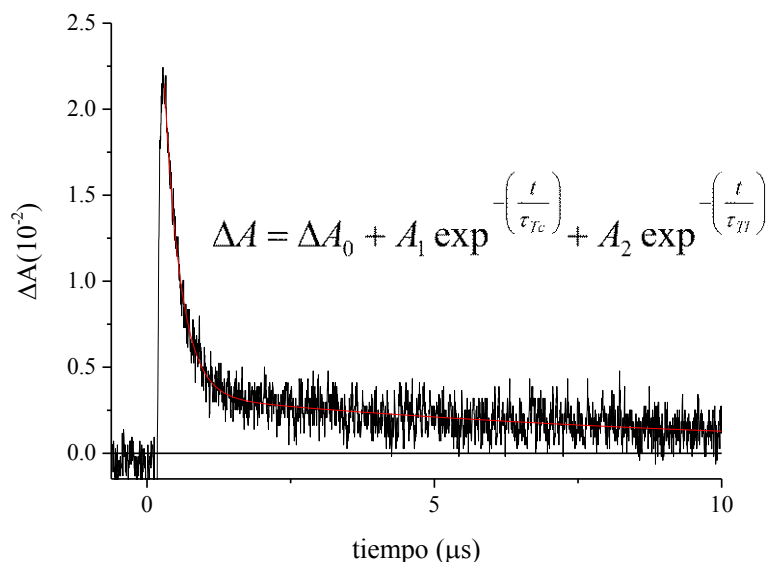


Figura 8.5. Decaimiento de la absorbancia con el tiempo de solución de Ptr saturada en Ar, pH 5,5, $\lambda_{ana} = 430$ nm, $A_{355nm} = 0,5$, escala $2 \mu s/div$, $[Ptr] = 100 \mu M$.

8.2.2 Desactivación de los estados tripletes de Ptr por aminoácidos

Con el objetivo de estudiar la interacción de los $^3Ptr^*$ con los aminoácidos se plantearon experimentos de *LFP*, utilizando el equipo descrito en el Capítulo 7. Esta técnica nos permitió determinar la constante de desactivación total de $^3Ptr^*$ por Trp, Tyr, His, Met. Los experimentos se realizaron con soluciones acuosas a pH 5,5, las cuales contenían el sensibilizador y concentraciones crecientes del aminoácido. Se burbujeó cada mezcla con Ar para eliminar el oxígeno en el medio, y luego se registró la señal del decaimiento de los estados excitados tripletes para cada solución. Después de tener las señales se obtuvieron los tiempos de vida del estado triplete (τ_T) en cada concentración del aminoácido. Utilizando la ecuación de Stern-Volmer, se graficó (τ_T^0/τ_T vs concentración del aminoácido) y se calcularon los valores de las pendientes que corresponde a las constantes de desactivación total de $^3Ptr^*$ por el respectivo aminoácido.

Teniendo en cuenta que ya se ha caracterizado la participación del estado excitado triplete de la pterina^{2,3,4,5} en procesos fotosensibilizados con diferentes sustratos, se realizaron experimentos de desactivación por los diferentes aminoácidos. Se determinaron las constantes de velocidad, registrando el decaimiento a una λ fija donde absorbe los tripletes de la Ptr (430 nm) para diferentes concentraciones de aminoácidos. En la Figura 8.6 se pueden observar los decaimientos de la Ptr obtenidos a diferentes concentraciones de Trp. A partir de estos decaimientos se obtuvieron los tiempos de vida (τ_{TI} y τ_{Te}), aplicando la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación (8.1)),

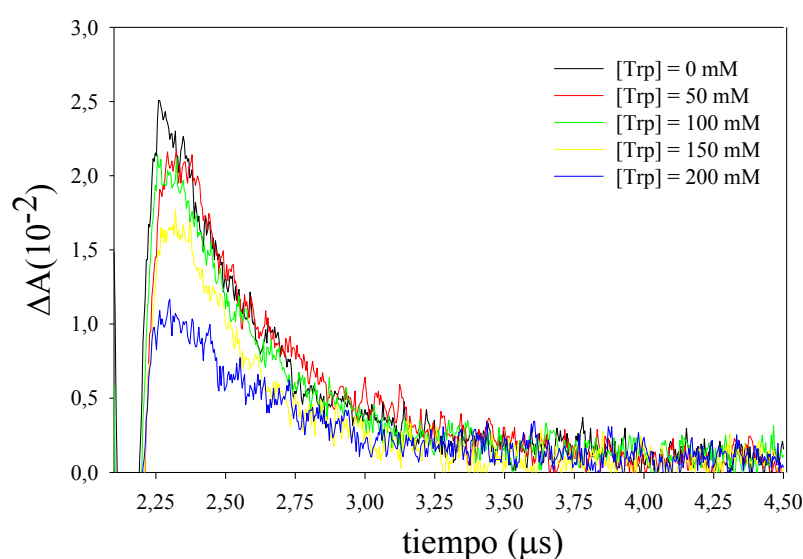


Figura 8.6. Decaimiento de los transientes de Ptr registrada a partir de la evolución temporal a ΔA_{430} nm, luego del pulso de laser en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Trp. $[Ptr] = 100 \mu M$.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8.7, donde se puede observar que el comportamiento es lineal en todos los casos. A partir de la pendiente de las gráficas se calcularon los valores de k_q para cada *quencher* analizado. Además se puede observar que existe un efecto sobre el τ_{TL} de la Ptr mientras para el τ_{TC} no se observa. En estos experimentos se presentan los resultados utilizando como desactivador a la Tyr ya que los intervalos de concentración en que realizaron las pruebas son mucho menores que lo usados en la desactivación de los estados singletes.

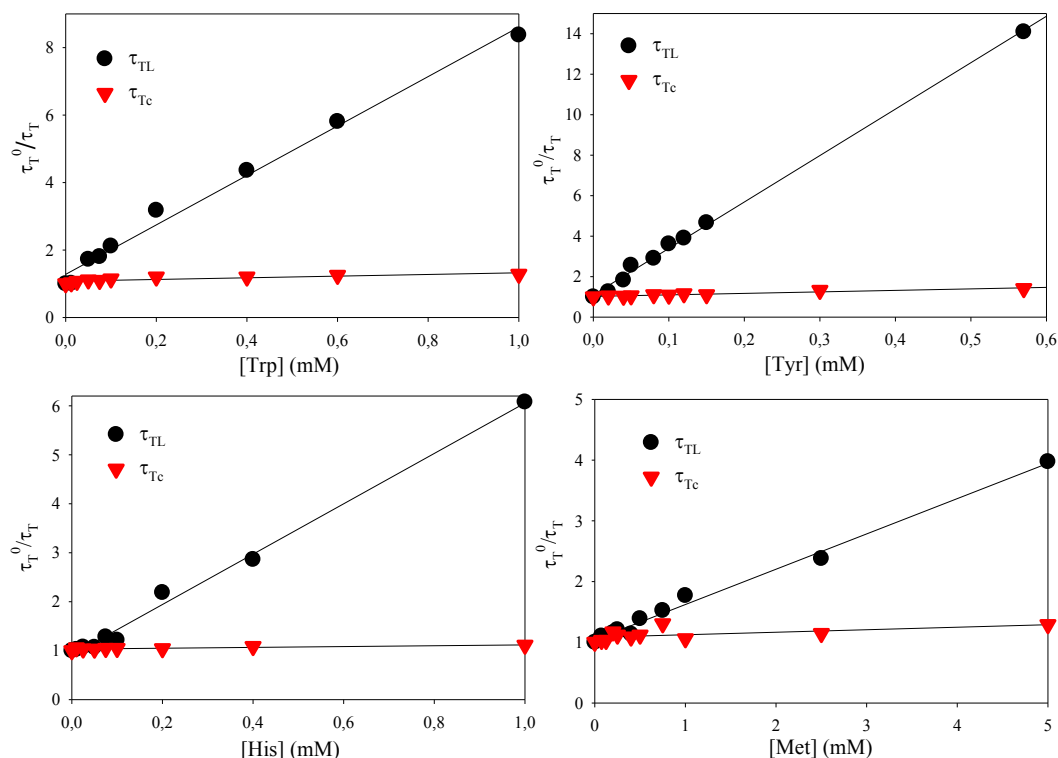


Figura 8.7. Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de los estados excitados tripletes de Ptr por aminoácidos, pH 5,5, $\lambda_{exc} = 355$ nm, $\lambda_{ana} = 430$ nm, $A_{355nm} = 0,5$, $[Ptr] = 100$ μ M.

En la Tabla 8.3 se resume los valores de las constantes de desactivación obtenidas a partir de las pendientes, para cada uno de los compuestos correspondientes a la especie de tiempo largo (τ_{TL}) y tiempo corto (τ_{TC}) de la Ptr.

Tabla 8.3. Valores de constantes de Stern-Volmer, de desactivación del estado triplete de la Ptr por aminoácidos.

<i>Quencher</i>	k_q (10^9) ($M^{-1} s^{-1}$) (τ_{TL})	k_q (10^9) ($M^{-1} s^{-1}$) (τ_{TC})
Triptófano	$1,5 \pm 0,1$	$3,1 \pm 1$
Tirosina	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 1$
Histidina	$1,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 1$
Metionina	$0,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 1$

Estos resultados permiten afirmar que existe desactivación de los estados excitados de Ptr por aminoácidos, siendo mayor el *quenching* para la Tyr (10^9) que para otros aminoácidos como la Met (10^8), confirmando así, que existe una interacción importante, que podría ser la que conlleve a generar una transferencia de electrones entre el estado triplete de la Ptr y el sustrato, y de esta forma llevar a la oxidación del sustrato.

Bibliografía

1. Rokos, H.; Beazley, W. D.; Schallreuter, K. U. . ; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **292**, 805–811 (2002).
2. Serrano, M. P. . Ph.D. Thesis; La Plata; (2014).
3. Petroselli, G.; Dantola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; and Thomas, A. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3001–3011 (2008).
4. Dántola, M. L.; Gojanovich, A. D.; Thomas, A. H. ; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **424**, 568–572 (2012).
5. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Roitman, K.; Morales, M. M.; Dántola, M. L. ; *J. Photochem Photobiol. B.* **120**, 52–58 (2013).

Capítulo 9: Degradación fotosensibilizada de tirosina libre

En este capítulo se presentan los resultados del estudio de la oxidación de tirosina (Tyr) fotoinducida por Ptr, bajo irradiación UV-A en solución acuosa. La Tyr es una molécula importante en el estudio de los efectos fotodinámicos de la radiación UV-A en sistemas vivos, no solo debido a la reactividad con $^1O_2^{1,2}$, sino además porque este aminoácido juega un rol importante en la polimerización y *cross-linking* de proteínas^{3,4}, procesos que se inician por radicales de Tyr⁵. Este aminoácido puede ser foto oxidado mediante mecanismos tipo I y/o tipo II (Capítulo 1). En este estudio se investigó la contribución de ambos tipos de mecanismos en la fotosensibilización por Ptr, se evaluó el efecto del oxígeno molecular (O_2) en la reacción y la participación de los diferentes estados excitados de la Ptr. Por otra parte, se analizaron los fotoproductos y se planteó un mecanismo de reacción

9.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar Tyr

El primer objetivo de este estudio fue averiguar si la Ptr era capaz de inducir la oxidación de Tyr en solución acuosa bajo irradiación UV-A. Por lo tanto, soluciones acuosas que contenían Ptr y Tyr fueron expuestas a irradiación (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*) por diferentes períodos de tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo en el rango de pH 5,5 – 6,0, donde la Ptr está presente en un 99% en su forma ácida (pK_a 7,9⁶). Bajo estas condiciones experimentales sólo la Ptr absorbe radiación (Figura 9.1). Las muestras se irradiaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico por diferentes períodos de tiempo, luego se analizaron por diferentes técnicas tales como *espectroscopía UV-Vis*, *HPLC-PDA* y *fluorescencia*. Por otra parte, se realizó la detección enzimática de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Capítulo 7).

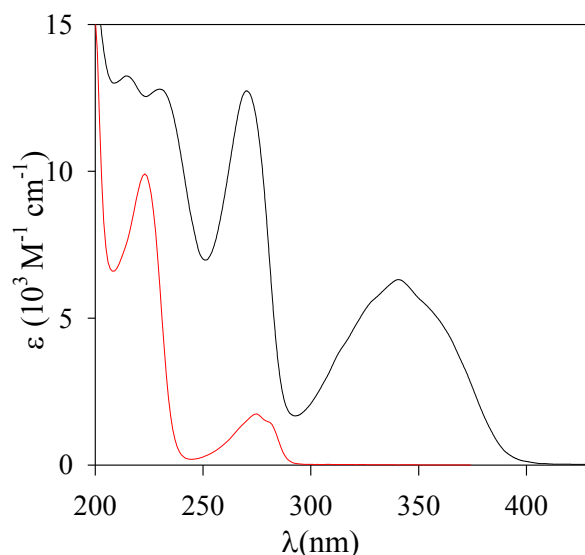


Figura 9.1. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Ptr y Tyr. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{Tyr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; pH 5,5.

9.1.1 Análisis espectroscópico

En la Figura 9.2 se presentan los espectros de absorción de soluciones que contienen Tyr y Ptr a distintos tiempos de fotólisis. Como se puede observar, se producen cambios en los espectros de absorción de la solución, lo que indica que existe un cambio químico en la composición de la misma. Estos resultados sugieren la formación de productos que absorben a longitudes de onda mayores a 300 nm, ya que la absorbancia a esta longitud de onda aumenta en función del tiempo de irradiación (Figura 9.2 (b)). Nótese además que se genera una nueva banda de absorción con un máximo centrado en 480 nm.

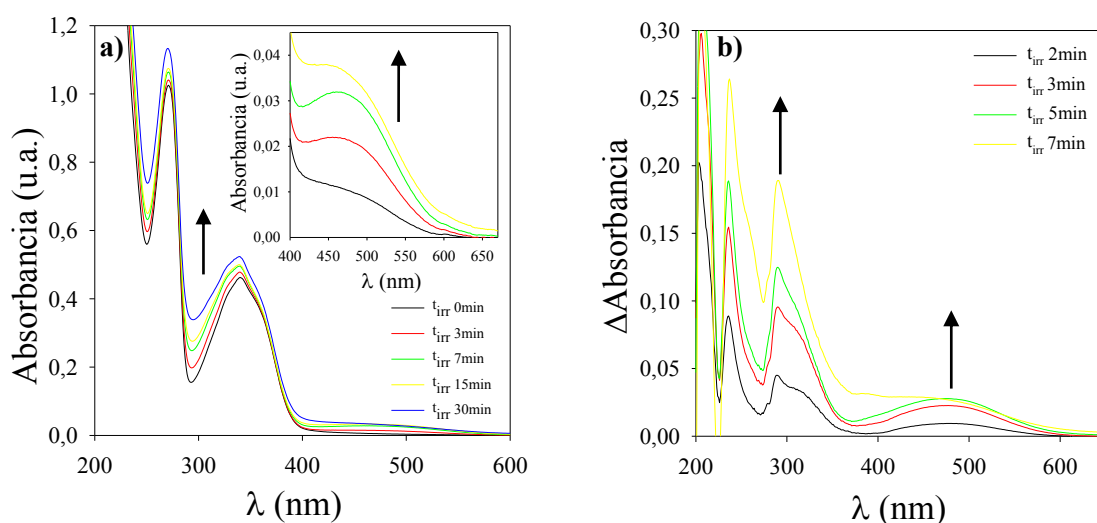


Figura 9.2. (a) Espectros de absorción de soluciones de Ptr y Tyr irradiadas durante diferentes periodos de tiempo. Inset: detalle de los espectros entre 400 y 650 nm, (b) Espectros diferencia. $[\text{Ptr}]_0 = 76 \mu\text{M}$; $[\text{Tyr}]_0 = 70 \mu\text{M}$; pH 5,5; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

9.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Se realizó el análisis cromatográfico de las muestras irradiadas con el equipo HPLC con detector espectrofotométrico (HPLC-PDA). Se realizó el análisis a 275 nm y 340 nm para observar el pico de la Tyr y la Ptr, respectivamente. Las medidas se realizaron utilizando la Fase Móvil I y la columna Synergi Polar RP (Capítulo 7).

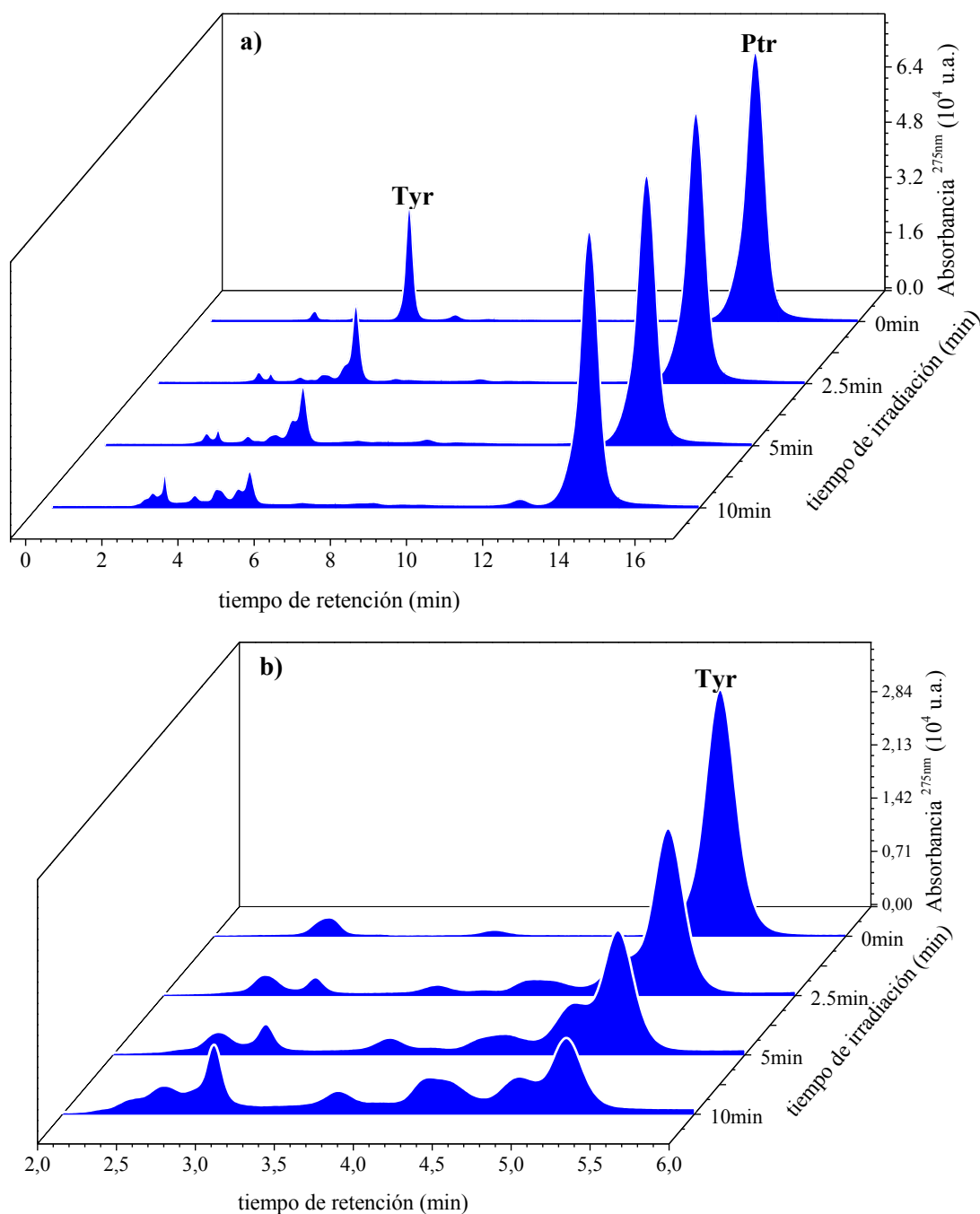


Figura 9.3. (a) Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y Tyr equilibradas con aire, (b) Segmento de los cromatogramas entre 2 min y 6 min. $[Ptr]_0 = 76 \mu M$; $[Tyr]_0 = 70 \mu M$; $pH = 5,5$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{ana} = 275 \text{ nm}$.

En la Figura 9.3(a) se pueden observar los cromatogramas registrados para el seguimiento del consumo de Tyr. En el tiempo cero se observó una buena separación entre la Tyr y Ptr, con tiempos de retención (t_r) de 5,2 min y 14 min, respectivamente. Los cromatogramas de las muestras irradiadas mostraron el descenso del pico del aminoácido, además de la generación de varios productos con t_r menor a la Tyr (Figura 9.3 (b)).

A partir de estos resultados se presentan los perfiles de concentración (Figura 9.4), integrando el área bajo la curva de los picos de Tyr y Ptr en cada tiempo de irradiación. Se puede observar que la concentración de Tyr disminuye como función del tiempo de irradiación, mientras que la concentración de Ptr permanece constante. Además se observó la generación de H_2O_2 (Figura 9.4), sin embargo, la velocidad inicial de producción de H_2O_2 fue menor ($1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}/\text{min}$), que la velocidad inicial de consumo de Tyr ($-5,3 \pm 1,7 \mu\text{M}/\text{min}$).

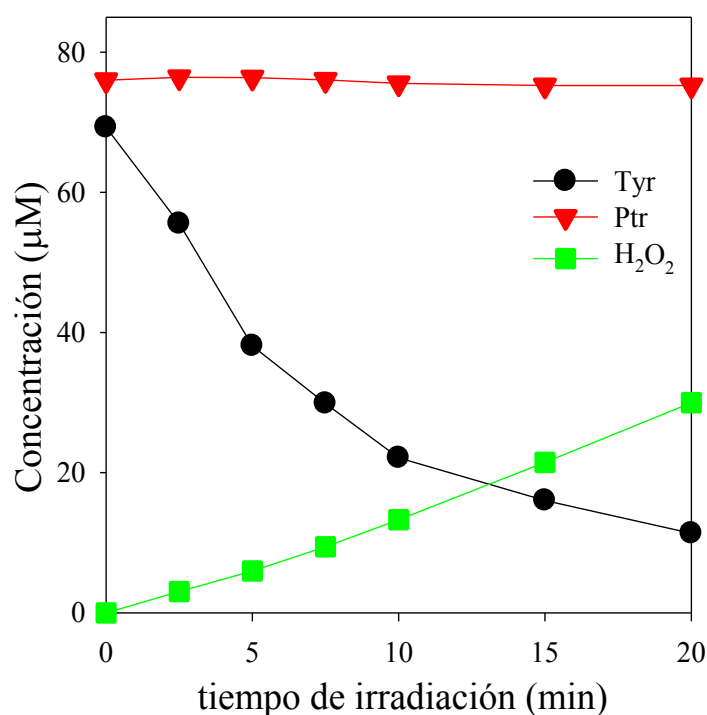


Figura 9.4. Evolución de la concentración de Tyr, Ptr y H_2O_2 en solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A en función del tiempo de irradiación. $[\text{Ptr}]_0 = 76 \mu\text{M}$; $[\text{Tyr}]_0 = 70 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Tyr}) = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Ptr}) = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

Teniendo en cuenta las características de emisión que posee la Tyr (Sección 4.1.3), se realizaron experimentos con el detector de fluorescencia (HPLC-FL). Los cromatogramas se registraron a 275 nm y se midió la emisión a 300 nm. En estas condiciones se obtuvo un pico con $t_r = 5,3 \text{ min}$ (Figura 9.5, Inset), el cual disminuye en

función del tiempo de irradiación. Además, no se registraron señales para ninguno de los productos en estas condiciones, demostrando que la Tyr está siendo consumida debido al proceso fotosensibilizado en presencia de Ptr. Además, la cinética de consumo analizada con ambos detectores (PDA y FL) coincide dentro del error experimental, lo que confirmó que el aminoácido está siendo sometido a un proceso de degradación fotosensibilizada.

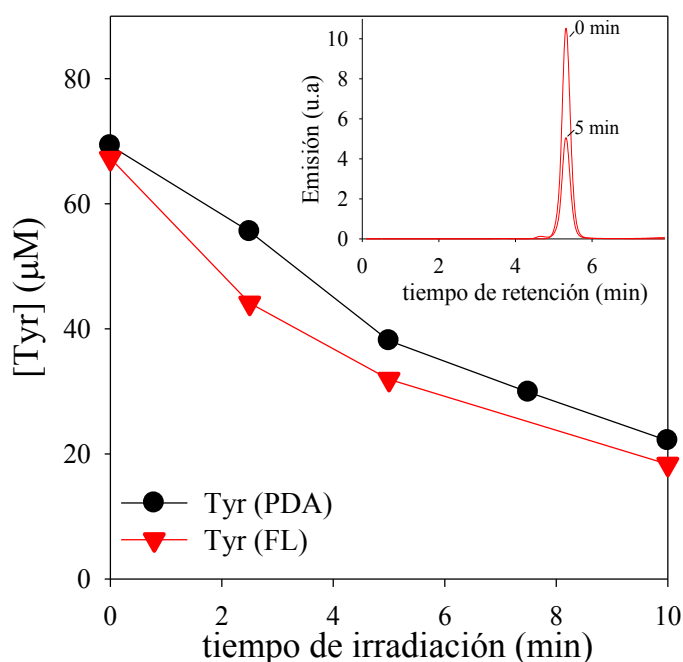


Figura 9.5. Comparación de la concentración de Tyr, medida con el detector HPLC-PDA/FL, de una solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A como función del tiempo de irradiación en presencia de Ptr; $[Ptr]_0 = 76 \mu\text{M}$; $[Tyr]_0 = 70 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; Inset Cromatogramas registrados con el detector HPLC-FL, condición $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$.

9.1.3 Medida electroquímica de la concentración de O_2

Para determinar si el oxígeno disuelto está interviniendo en la reacción, se realizaron pruebas con un electrodo selectivo de oxígeno, con el cual se determinó la concentración de esta especie a distintos tiempos de irradiación. Debido a que la concentración de O_2 en soluciones aireadas a temperatura ambiente es alrededor de $250 \mu\text{M}$, para detectar cambios significativos en la concentración de O_2 se usaron concentraciones iniciales de Tyr más elevadas que en los experimentos descritos anteriormente. Las muestras fueron irradiadas en una celda especial acoplada al electrodo de O_2 (Capítulo 7) y se analizaron por HPLC-PDA. Los resultados indicaron que la concentración de O_2 disminuye en función del tiempo de irradiación (Figura 9.6). Los controles realizados de solución de Ptr irradiada, mostraron que el consumo de O_2

fue mucho menor que el observado en presencia del aminoácido (Figura 9.6). Este pequeño descenso de la concentración de O_2 puede deberse a la lenta fotólisis del fotosensibilizador.

En otros experimentos, se determinó la relación entre el consumo de O_2 y Tyr ($\Delta[O_2]/\Delta[Tyr]$), en donde las soluciones fueron analizadas por HPLC, antes y después de ser irradiadas, para obtener la concentración inicial y final respectivamente. Un valor de 2,3 fue obtenido para $\Delta[O_2]/\Delta[Tyr]$, calculado para diferentes tiempos de irradiación.

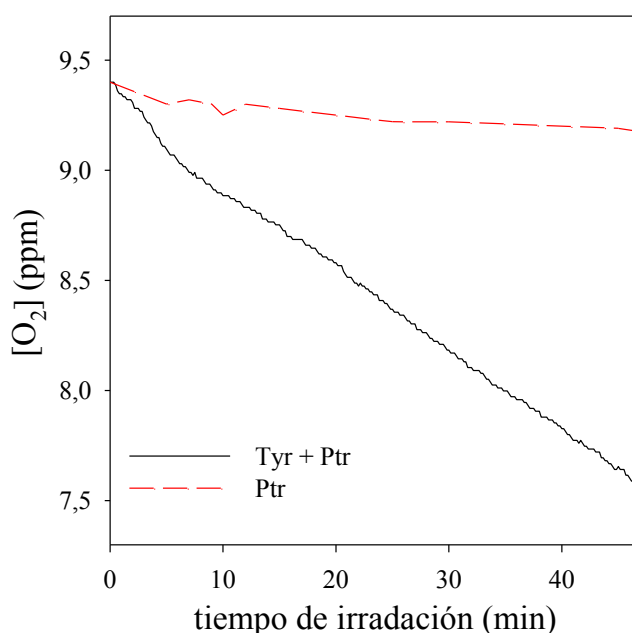


Figura 9.6. Evolución de la concentración de O_2 en soluciones irradiadas de Ptr en ausencia y presencia de Tyr como función del tiempo. $[Tyr]_0 = 400 \mu M$; $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; pH = 5,5.

9.1.4 Controles

Se realizaron controles midiendo los espectros de absorción y los perfiles de concentración de soluciones que contenían Ptr y Tyr dejadas en oscuridad por un período de tiempo (60 min). Los resultados obtenidos indicaron que no existen cambios apreciables en los espectros de absorción ni en las concentraciones, lo que lleva a concluir que no existe una reacción térmica entre la Ptr y Tyr durante el tiempo que dura el experimento.

Por otra parte, se hicieron controles donde se irradió una solución acuosa de Tyr a 350 nm en ausencia del fotosensibilizador. Las pruebas se realizaron en las mismas condiciones que los experimentos presentados en la *Sección 9.1.2* y se analizaron tanto

los cambios espectrales como las variaciones en la concentración del aminoácido. El resultado indicó que durante este tiempo (60 min) no existe ningún cambio químico por absorción directa de Tyr, siendo esto lógico pues a la longitud de onda que se irradia (350 nm), la Tyr no absorbe radiación (Figura 9.1).

9.2 Análisis de fotoproductos

9.2.1 Cromatografía líquida (HPLC)

En la Figura 9.7 se presentan los espectros de absorción de los principales productos generados en la reacción fotosensibilizada de Tyr por Ptr. Los espectros obtenidos coinciden con los espectros de oxidación típicos de la Tyr. De esta manera, P_2 es compatible con L-3,4- dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ($t_r = 3,87$ min), P_3 con L-Dopacroma ($t_r = 4,3$ min) y P_4 con los dímeros de Tyr (Tyr_2) ($t_r = 4,7$ min).

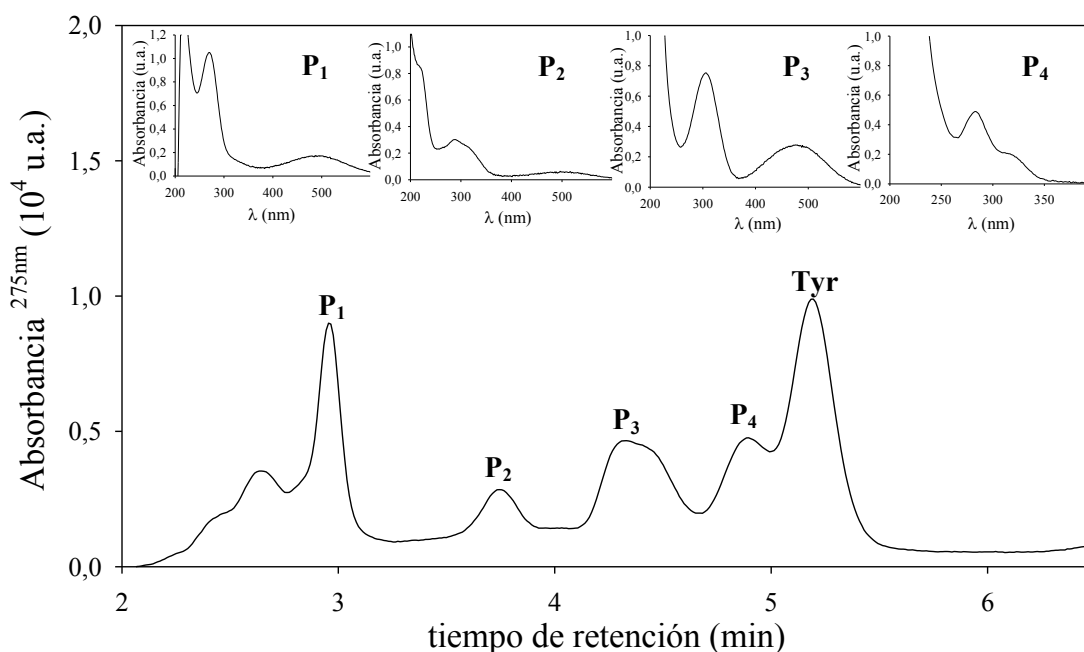


Figura 9.7. Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min. Insets: espectros de absorción de los productos registrados por HPLC-PDA. $[Ptr]_0 = 76 \mu M$; $[Tyr]_0 = 70 \mu M$; $pH = 5,5$; $\lambda_{ana} = 275$ nm; $\lambda_{irr} = 350$ nm.

Uno de los productos de oxidación de la Tyr es la L-DOPA. En las condiciones de corrida utilizada hasta el momento no se observó una buena separación de algunos productos, por lo tanto, en este caso se utilizó la columna Júpiter Proteo y la Fase Móvil I (Capítulo 6), las cuales mostraron una mejor separación de este producto (L-DOPA).

Para identificar la formación de L-DOPA en la reacción fotosensibilizada, se realizaron pruebas con el patrón interno. Se registró el cromatograma de una muestra del patrón puro de L-DOPA, el cual mostró un pico con $t_r = 4,5$ min y el espectro muestra un máximo de absorción en 280 nm (Figura 9.8 (a)). Después, se tomaron los cromatogramas de una solución irradiada de Tyr y Ptr con y sin el patrón de L-DOPA. Los resultados indicaron que el pico P_2^* en presencia del patrón, en comparación con una solución sin el mismo, coincidiendo con los t_r y el espectro de absorción (Figura 9.8), lo cual es una fuerte evidencia que la L-DOPA es uno de los productos formados en la reacción. Por otra parte, se observó una disminución de los otros picos, como consecuencia de la dilución (Figura 9.8).

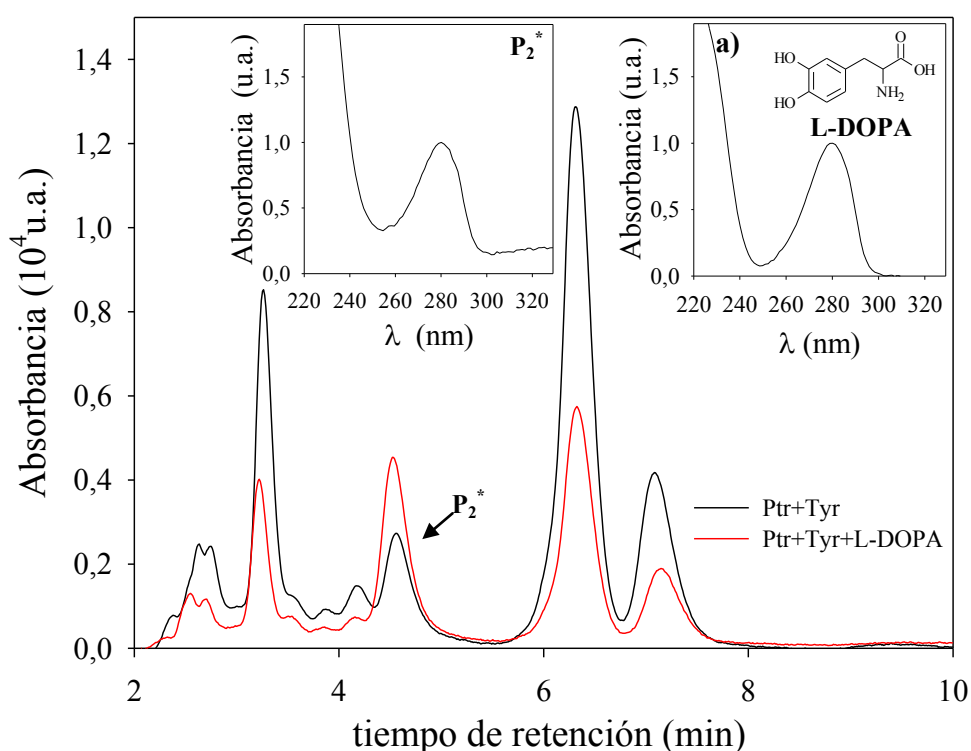


Figura 9.8. Cromatogramas obtenidos por análisis con HPLC-PDA de soluciones irradiadas con y sin patrón L-DOPA; tiempo de irradiación 10 min. (a) Espectro de absorción L-DOPA puro. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; pH= 5,5.

Por otra parte, la L-Dopacroma es otro producto de oxidación de la Tyr *in vivo*, con características espectrales particulares, ya que su espectro de absorción en solución acuosa presenta una banda de baja intensidad centrada en 475 nm. En la Figura 9.7 se observa que a $t_r = 4,3$ min, aparece un pico (P_3), el cual tiene un espectro de absorción con un máximo en 480 nm aproximadamente.

Para confirmar que uno de los productos de oxidación era L-Dopacroma, se hicieron experimentos utilizando el método de patrón interno. Teniendo en cuenta que este

compuesto no es comercial, pero puede obtenerse a partir de la oxidación enzimática de Tyr o L-DOPA. Por esto se realizó la actividad enzimática de acuerdo al método de Pomerantz⁷, midiendo espectrofotométricamente la formación de L-Dopacroma a 475 nm. La reacción se llevó a cabo en buffer KH_2PO_4 16,75mM, a pH 6,5 y temperatura de 37°C, usando L-Tyr ó L-DOPA como sustrato. El producto generado por la reacción enzimática, se midió por HPLC-PDA y se obtuvo el cromatograma, el cual tiene un único pico con $t_r = 4.3\text{min}$, además el espectro de absorción mostró una banda con máximo de absorción centrada en 475 nm (Figura 9.9 (a)). Después se realizó una mezcla de una muestra irradiada de Ptr y Tyr con L-Dopacroma generada enzimáticamente. Los resultados indicaron que el t_r de la muestra irradiada con y sin el patrón interno coincide, y además, los espectros de absorción para ambas muestras analizadas son similares (Figura 9.9). Este resultado sugiere fuertemente que la L-Dopacroma es uno de los productos que se forma en la reacción fotosensibilizada entre la Ptr y Tyr bajo irradiación UV-A.

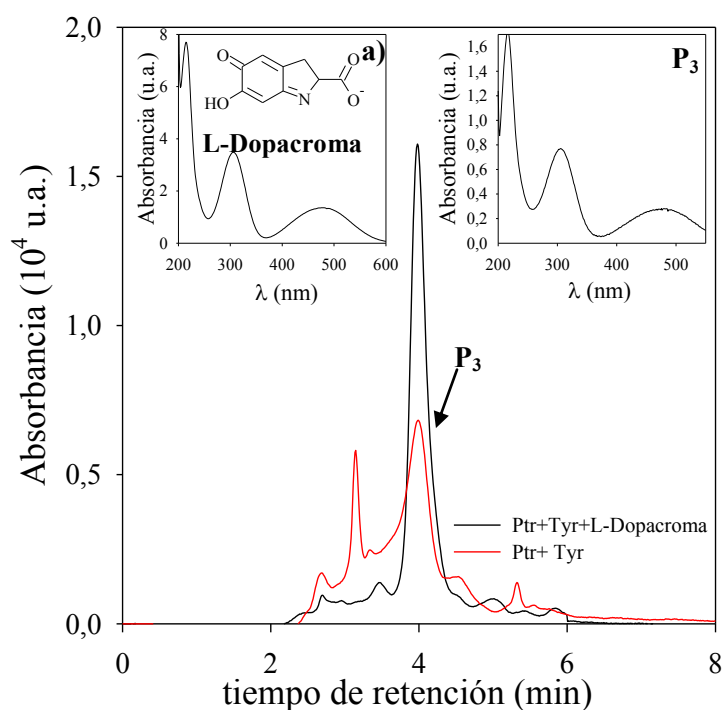


Figura 9.9. Cromatogramas obtenidos por análisis con HPLC-PDA de soluciones irradiadas y con patrón interno L-Dopacroma, $t_{irr} = 10\text{ min}$; $\lambda_{ana} = 480\text{ nm}$; (a) Espectro de absorción L-Dopacroma puro; $[\text{Ptr}]_0 = 80\mu\text{M}$, $[\text{Tyr}]_0 = 70\mu\text{M}$, pH= 5,5.

Se ha reportado que en la oxidación de Tyr, uno de los productos generados son los dímeros de Tyr (Tyr_2) (Sección 5.1.2). Para determinar la formación de este compuesto

en la reacción fotosensibilizada de Tyr por Ptr, se analizaron las soluciones irradiadas con el detector HPLC-FL, utilizando como condición de análisis la correspondiente a Tyr₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$), en donde se observó la generación un único pico, el cual no fue detectado en el tiempo cero de irradiación (Figura 9.10, Inset). Bajo nuestras condiciones experimentales, el área de pico correspondiente a Tyr₂ aumenta con el tiempo de irradiación (Figura 9.10,), alcanzando un máximo alrededor de los 10 min y luego decrece lentamente. Este descenso puede adjudicarse a un proceso de degradación por irradiación directa de Tyr₂ o a una reacción fotosensibilizada inducida por Ptr.

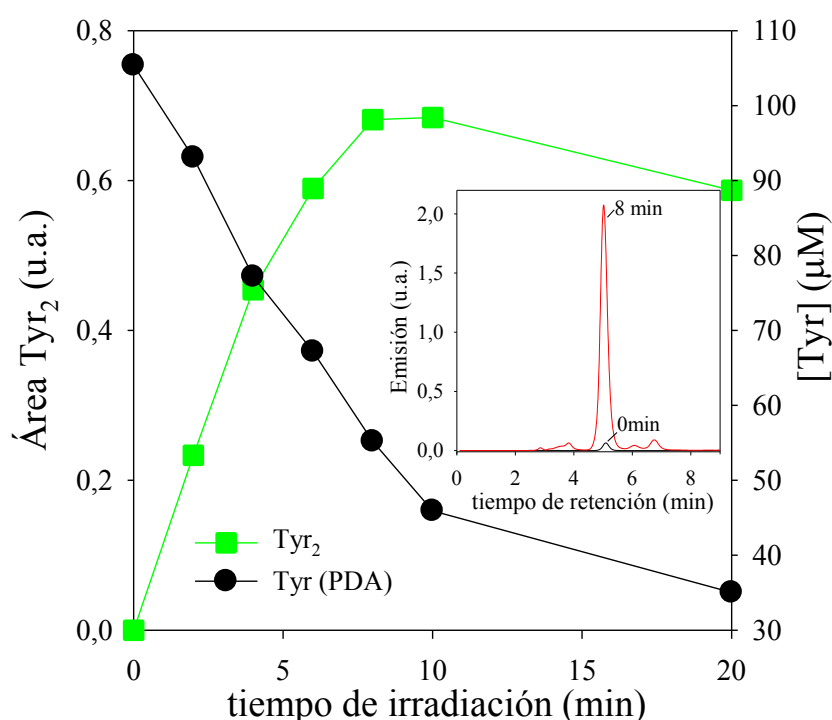


Figura 9.10. Perfiles de concentración de Tyr y formación de Tyr₂ en solución acuosa aireada en función del tiempo de irradiación. Inset: Cromatogramas registrados por HPLC-FL para Tyr₂. [Tyr]₀ = 70 μM; [Ptr]₀ = 76 μM; pH = 5,5; Condición emisión Tyr₂ $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$.

9.2.2 Fluorescencia

En las secciones anteriores se demostró la formación de un producto fluorescente derivado de la reacción fotosensibilizada y se sugirió que el mismo podría ser Tyr₂. Para investigar en mayor detalle la fluorescencia de las soluciones irradiadas, se realizaron experimentos de emisión en estado estacionario con el equipo descrito en la *Sección 7.1.4*. Para ello, las soluciones que contenían Ptr y Tyr fueron expuestas a radiación (Sistema de irradiación I, *Sección 6.3.1*) y la medida de los espectros de emisión se realizó utilizando como condición de análisis $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 350 - 550 \text{ nm}$, para

los diferentes tiempos de irradiación. En este rango de medida, la Ptr absorbe y fluoresce con un máximo a 439 nm, por lo que la emisión del fotosensibilizador está parcialmente superpuesta a la emisión de Tyr₂. Teniendo en cuenta que la Ptr en las condiciones de irradiación no se consume, se tomó el espectro de emisión de las soluciones antes de la irradiación. Luego, se midió la emisión de cada solución irradiada y se le sustrajo el espectro del tiempo cero, obteniéndose la emisión neta de los productos de fotosensibilización.

Los resultados presentados en la Figura 9.11 muestran los espectros de emisión corregidos, en donde se puede observar una banda de emisión que coincide con el máximo reportado para la Tyr₂⁸ (405 nm), y además, la intensidad del espectro de emisión de este producto se incrementa, en función del tiempo de irradiación. Este resultado es una evidencia más a favor de la fotodimerización de Tyr inducida por Ptr.

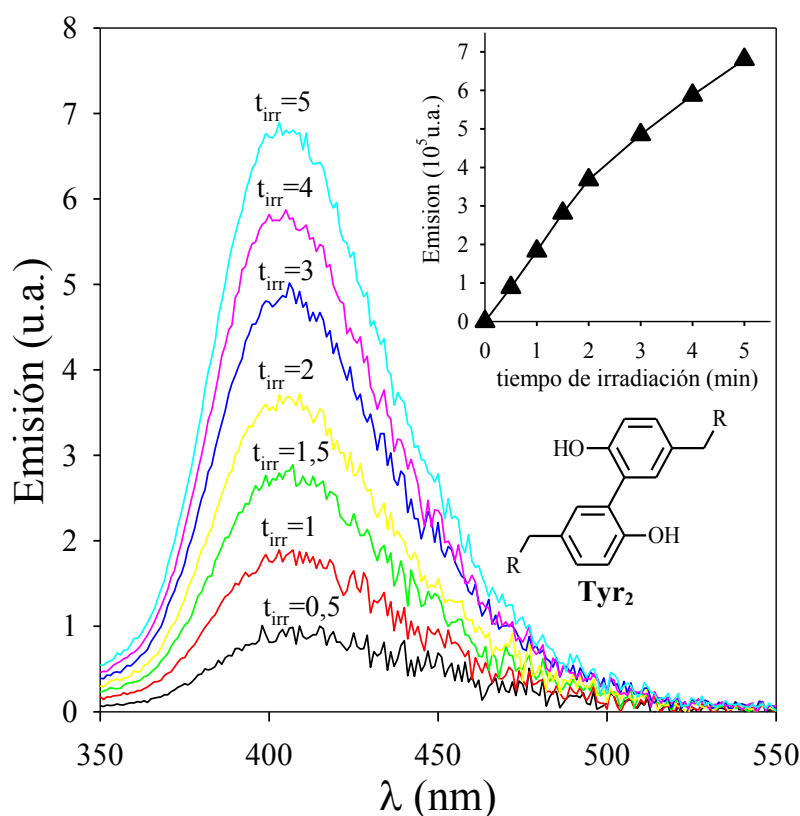


Figura 9.11. Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y Tyr. Inset: aumento de la intensidad de la fluorescencia a 405 nm como función del tiempo de irradiación; $[Tyr]_0 = 70 \mu M$; $[Ptr]_0 = 37 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{irr} = 350$ nm; Condiciones de emisión $\lambda_{exc} = 310$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm -550 nm.

9.2.3 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

El estudio de los fotoproductos por espectrometría de masas, llevado a cabo con el equipo descrito en la *Sección 7.1.3*, fue dividido en dos partes: (a) investigación de los compuestos oxigenados y (b) investigación de Tyr₂. El análisis de las muestras irradiadas que contenían Ptr y Tyr a pH 5,5 se llevó a cabo en modo positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻), sin embargo las señales con las cuales se observaron mejores resultados fueron en modo ESI⁺.

La fórmula molecular de la Tyr es C₉H₁₁NO₃ y su peso molecular es 181,0817 Da. Las soluciones sin irradiar mostraron dos picos a $t_r = 6,91$ min y $t_r = 11,19$ min, los cuales son asignados a la Tyr y Ptr, respectivamente. Nótese que los t_r difieren de aquellos registrados en los cromatogramas presentados en la *Sección 9.2.1*, lo cual es lógico dado que el equipo, la columna y el flujo de corrida fueron diferentes a los utilizados anteriormente. En la Figura 9.12 se presentan los espectros MS ESI⁺ de los picos observados para las soluciones sin irradiar. En el pico de $t_r = 6,91$ min, se detectó el ion molecular intacto de Tyr ($[M + H]^+ = [Tyr + H]^+$) a m/z 182,0817 Da. Con respecto al pico con $t_r = 11,19$ min, se detectó en el espectro MS el ion molecular intacto de Ptr ($[M + H]^+ = [Ptr + H]^+$) a m/z 164,0566 Da. Las muestras irradiadas mostraron la formación de diferentes productos, con t_r 4,51 min (P₁'), 5,48 min (P₂') 5,77 min (P₃') y 6,17 min (P₄').

Como ya se mencionó en la sección anterior uno de los productos oxigenados de la Tyr es la L-DOPA, la cual tiene una fórmula molecular C₉H₁₁NO₄ y masa molecular de 197,0766 Da. El espectro de masa que corresponde a P₁' con $t_r = 4,51$ min se presenta en la Figura 9.13. En este caso la m/z más predominante es 198,0764 Da, la cual corresponde a la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula de Tyr.

Por otra parte, el equipo UPLC-MS además de registrar los espectros MS de los compuestos, se puede utilizar para registrar los cromatogramas en modo MS. Esto significa una representación gráfica de la intensidad producida por los iones que llegan al detector, de un determinado valor de m/z , en función del t_r . En la Figura 9.13 (a) se presenta el cromatograma en modo MS ($[Tyr + O + H]^+$ a $m/z = 198,0764$ Da) para P₁' de una solución de Ptr y Tyr equilibrada con aire luego de 8 min de irradiación. Este cromatograma confirma que solo existe un pico correspondiente a esta m/z , lo que implica que se forma un solo producto con ese peso molecular. La integración del pico correspondiente a P₁' en función del tiempo de irradiación, mostró que la intensidad del

mismo aumenta en el tiempo (Figura 9.13 (b)). Este resultado confirma que uno de los productos generados en la reacción fotosensibilizada de Tyr por Ptr es la L-DOPA.

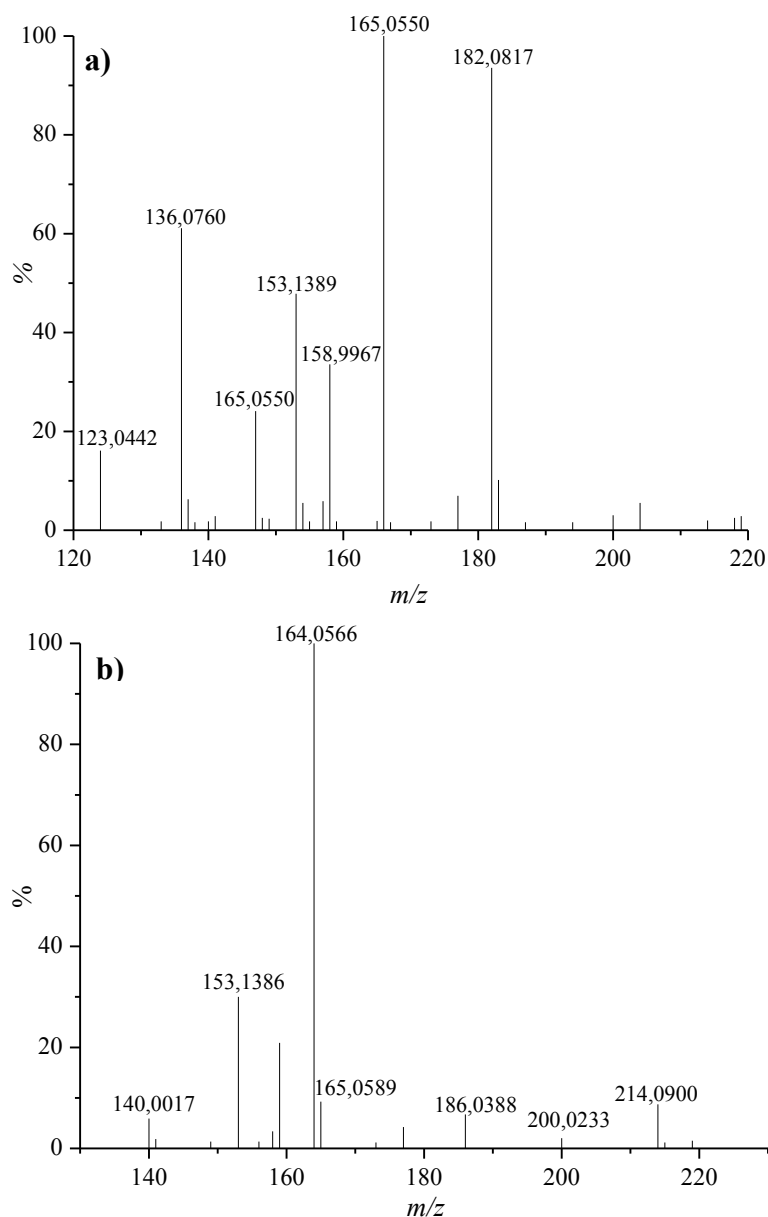


Figura 9.12. Espectros de masas de los picos con (a) t_r 6,91 min y (b) 11,19 min correspondientes a Tyr y Ptr, respectivamente, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar; $[Ptr]_0 = 100 \mu M$ y $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; Modo ESI⁺; voltaje = 50 V.

Por otra parte, el producto con t_r 5,73 min (P_2') mostró en el espectro de masa un ion con m/z de 214,0798 Da, que corresponde a la incorporación de dos átomos de oxígeno a la molécula de Tyr ($[Tyr + 2O + H]^+$) (Figura 9.14). Se obtuvieron los cromatogramas en modo MS, con el valor fijo de m/z 214,0798 Da, dando como resultado la formación de un único pico con este peso molecular (Figura 9.14 (a)), al integrar el área bajo la curva se observó un aumento en función del tiempo de irradiación (Figura 9.14 (b)).

Este resultado confirma que el aminoácido puede incorporar dos moléculas de oxígeno debido a la reacción fotosensibilizada entre la Tyr y la Ptr.

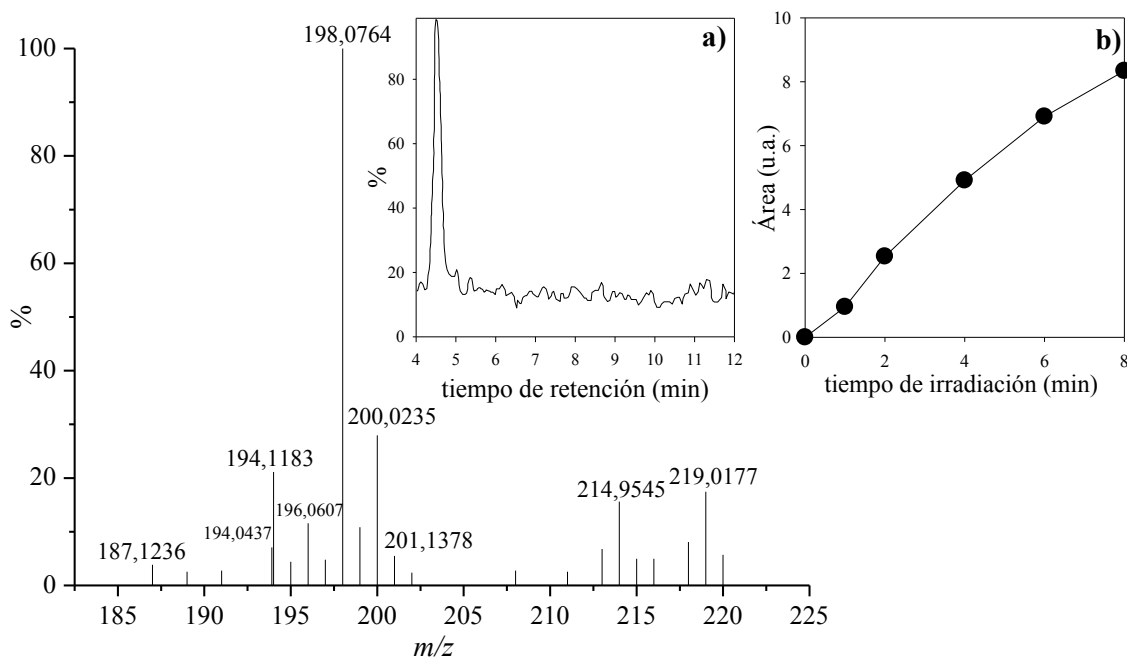


Figura 9.13. Espectro de masas de P_1' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 198,07 Da (b) Evolución del producto (P_1') en función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

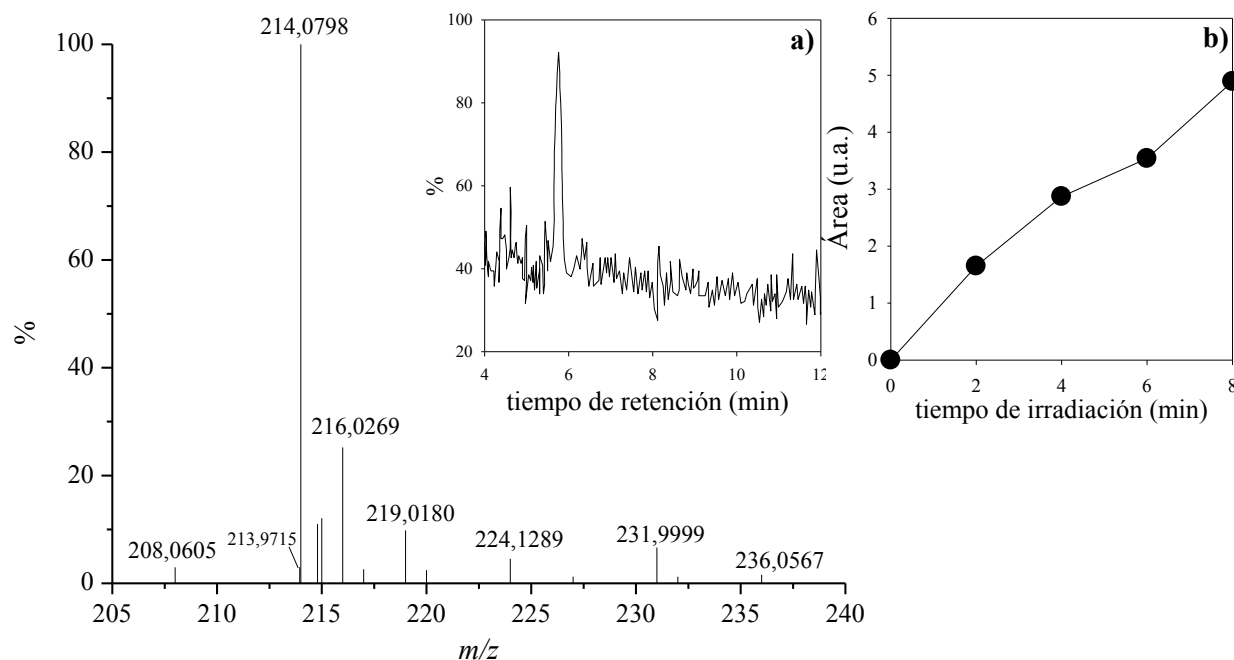


Figura 9.14. Espectro de masas de P_2' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 214,07 Da (b) Evolución del producto (P_2') en función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$ y $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Otro de los productos propuestos en la sección anterior es la L-Dopacroma. Este compuesto tiene fórmula molecular $C_9H_7NO_4$ y una masa molecular de 193,0453 Da. El producto con $t_r = 5,77$ min (P_3') mostró un espectro de masas con m/z 194,0451 Da (Figura 9.15) el cual coincide con la L-Dopacroma. El cromatograma obtenido a un valor de m/z fijo, mostró la formación de un solo pico (Figura 9.15 (a)). El área de este producto mostró un aumento a cada tiempo de irradiación (Figura 9.15 (b)). Este resultado, junto con lo obtenido por HPLC lleva a concluir que uno de los productos generados en la reacción es L-Dopacroma.

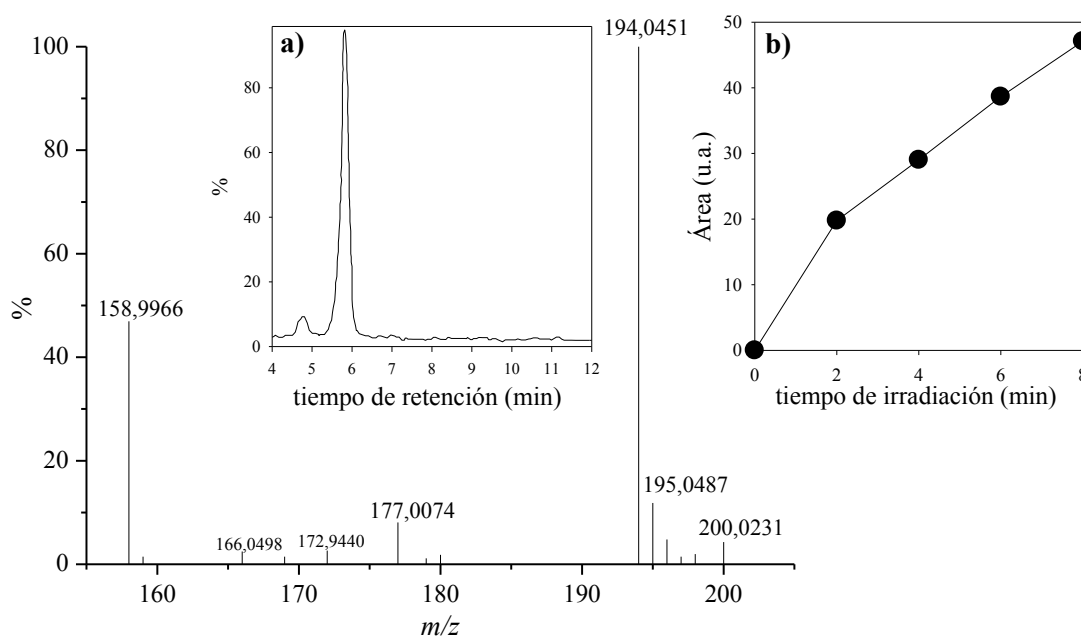


Figura 9.15. Espectro de masas de P_3' obtenido al irradiar soluciones de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 194,04 Da (b) Evolución del producto (P_3') en función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$ y $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Por otra parte, en las soluciones irradiadas se detectó un compuesto con peso molecular 361,13 Da $[2Tyr - 2H + H]^+$, el cual no fue detectado en las soluciones de Tyr y Ptr en ausencia de luz. Este peso molecular corresponde a la estructura del compuesto caracterizado llamado Tyr₂, el cual se forma en ambientes oxidativos^{9,10}. Este producto tenía $t_r = 6,17$ min (P_4') y presentó una m/z 361,1399 Da, el cual corresponde a Tyr₂ (Figura 9.16), indicando que los dímeros son generados en la reacción fotosensibilizada de Tyr por Ptr. Además, la cinética de formación de este producto, en estas condiciones, aumenta hasta los 5 min y después va disminuyendo, lo cual coincide con los resultados obtenidos anteriormente (Sección 9.2.1). La generación de Tyr₂ en esta reacción es

importante desde el punto de vista biológico porque implica que las pterinas podrían fotoinducir el *cross-linking* de proteínas *in vivo* (Capítulo 4).

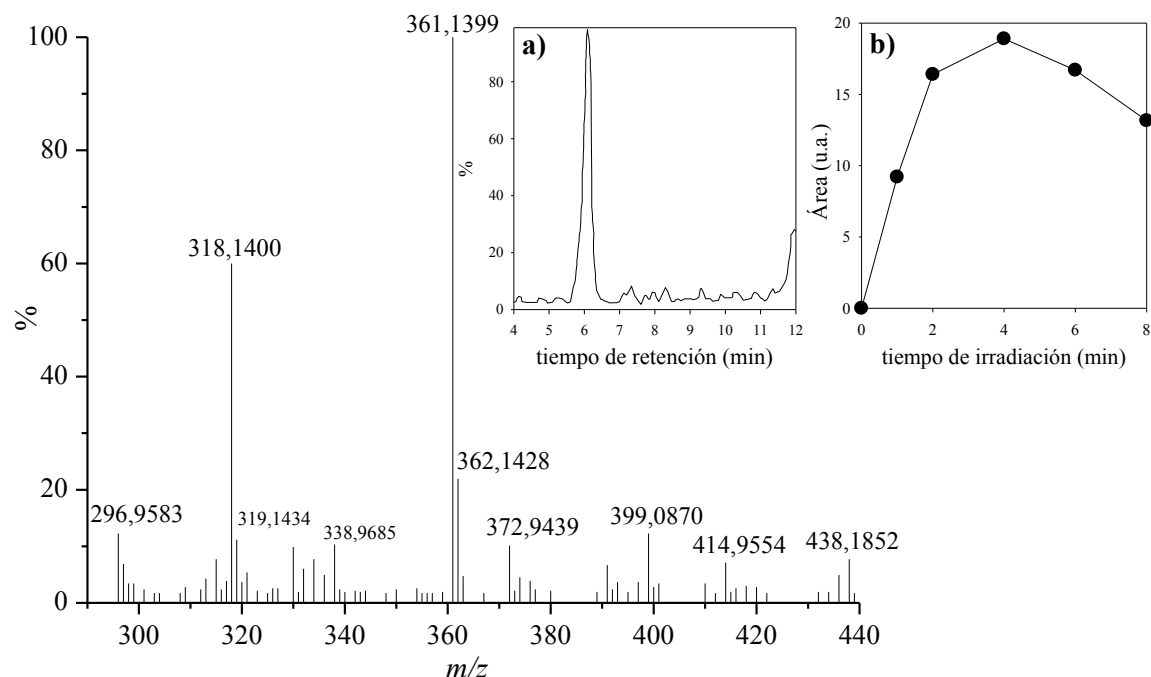


Figura 9.16. Espectro de masas de P_4' de soluciones irradiadas de Tyr en presencia de Ptr equilibradas con aire. **(a)** Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 361,13 Da **(b)** Formación de P_4' en función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[Tyr]_0 = 100 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

En la Tabla 9.1 se resumen los valores de m/z de los productos identificados, sacados de los espectros MS correspondientes a cada uno de los t_r .

Tabla 9.1. Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de Tyr inducida por Ptr en presencia de O_2 .

Producto	t_r (min)	Ion molecular m/z (Da)	
Tyr	6,91	182,08	$[Tyr + H]^+$
P_1'	4,51	198,07	$[Tyr + O + H]^+$
P_2'	5,73	214,07	$[Tyr + 2O + H]^+$
P_3'	5,77	194,04	$[Tyr + O - 3H]^+$
P_4'	6,17	361,14	$[2Tyr - 2H + H]^+$

9.3 Determinación del mecanismo de reacción

9.3.1 Rol del Oxígeno

Para dilucidar el rol del O_2 en la fotosensibilización de Tyr por Ptr, se realizaron experimentos con soluciones acuosas en ausencia de O_2 y saturadas en el mismo (100% O_2), y los resultados son comparados con los obtenidos en las soluciones aireadas (Figura 9.17). Los resultados indicaron que en ausencia de oxígeno, la concentración de Tyr no decrece significativamente y no se detectan fotoproductos. Por otra parte, los perfiles de concentración muestran claramente que la velocidad de desaparición de Tyr (Figura 9.17 (a)) y la producción de H_2O_2 fue mayor en soluciones equilibradas con aire que en soluciones saturadas con O_2 (Figura 9.17 (c)). La formación de Tyr₂, fue investigada en distintas atmósferas por HPLC-FL ($\lambda_{exc} = 310 \text{ nm} - \lambda_{em} = 400 \text{ nm}$). En la Figura 9.17 (b), se pueden observar que el aumento del área correspondiente a Tyr₂ en soluciones con saturación de O_2 , es menor en comparación con las soluciones aireadas. Por otra parte, en ausencia de O_2 no se observó la formación de este producto (Figura 9.17 (b)).

Estos resultados muestran que la reacción fotosensibilizada requiere O_2 para que ocurra. Sin embargo, la velocidad del proceso es mayor en las soluciones equilibradas con aire que en las soluciones saturadas con O_2 . Este comportamiento también ha sido observado en oxidaciones de nucleótidos fotosensibilizadas por pterinas^{11,12} y puede ser interpretado considerando que el O_2 es capaz de desactivar el estado triplete de la Ptr ($^3Ptr^*$) y de esta manera, la interacción con Tyr. Este resultado sugiere que $^3Ptr^*$ es la especie que inicia la reacción fotoquímica y que el 1O_2 no tiene una participación significativa en el proceso, pues la velocidad de consumo del sustrato en soluciones saturadas con O_2 debería ser del mismo orden o mayor que en las soluciones irradiadas en aire.

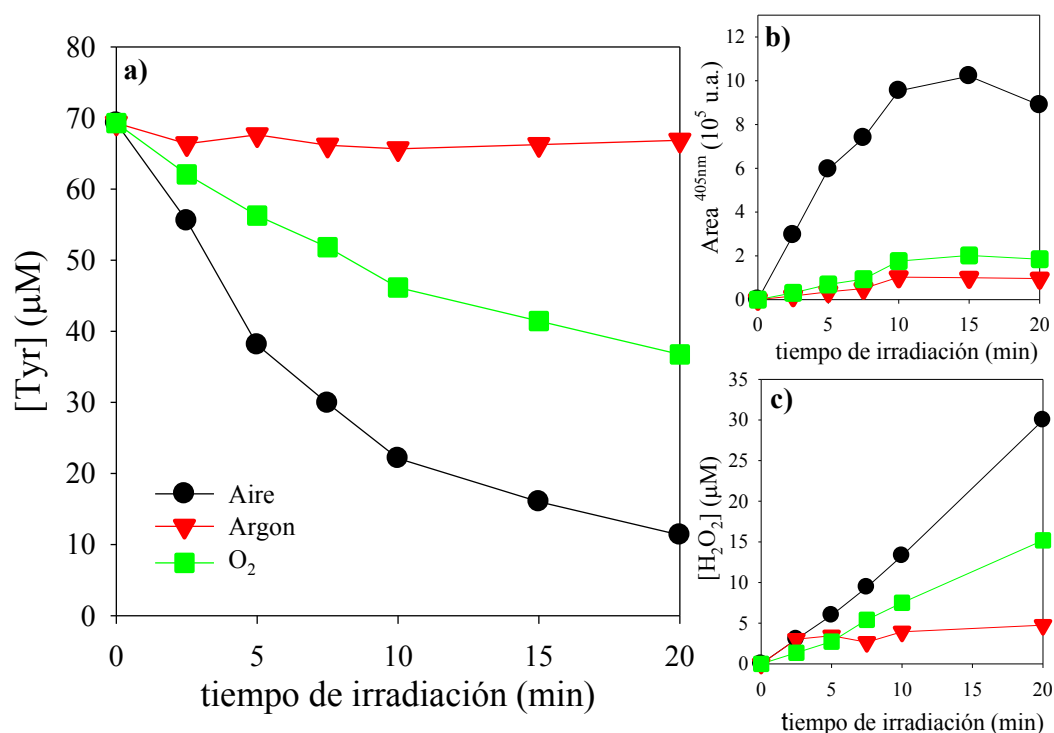


Figura 9.17. (a) Evolución de las concentración de Tyr en soluciones acuosas equilibras con aire y saturadas con Ar y O₂ en función del tiempo de irradiación. (b) Formación de Tyr₂. (c) Generación H₂O₂. [Tyr]₀ = 70 μM; [Ptr]₀ = 76 μM; pH 5,5; l = 1 cm

9.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Se realizaron experimentos en presencia de KI, ya que este compuesto desactiva eficientemente los estados tripletes de la Ptr ($^3Ptr^*$) a concentraciones entre 200 μM y 500 μM¹³ (Capítulo 6). Por lo tanto, este *quencher* se utilizó para evaluar la participación de los estados excitados del sensibilizador en el mecanismo de reacción. Se realizaron experimentos comparativos irradiando soluciones equilibradas con aire que contenían Tyr y Ptr en ausencia y presencia de KI (500 μM).

En la Figura 9.18 (a) se observa el perfil de concentración de la Tyr obtenida en la reacción fotosensibilizada en ausencia y presencia de KI. La presencia del desactivador inhibe la velocidad de consumo de Tyr, comparado con el experimento en ausencia de KI. También esta inhibición se observó en la producción de H₂O₂ y en la formación de Tyr₂ (Figura 9.18 (b) y (c)). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados y considerando que a la concentración utilizadas de KI, no se apagan los estados excitados singlete del fotosensibilizador¹³, la inhibición observada en el consumo de Tyr en presencia de este desactivador sugieren fuertemente la participación del $^3Ptr^*$ en la reacción.

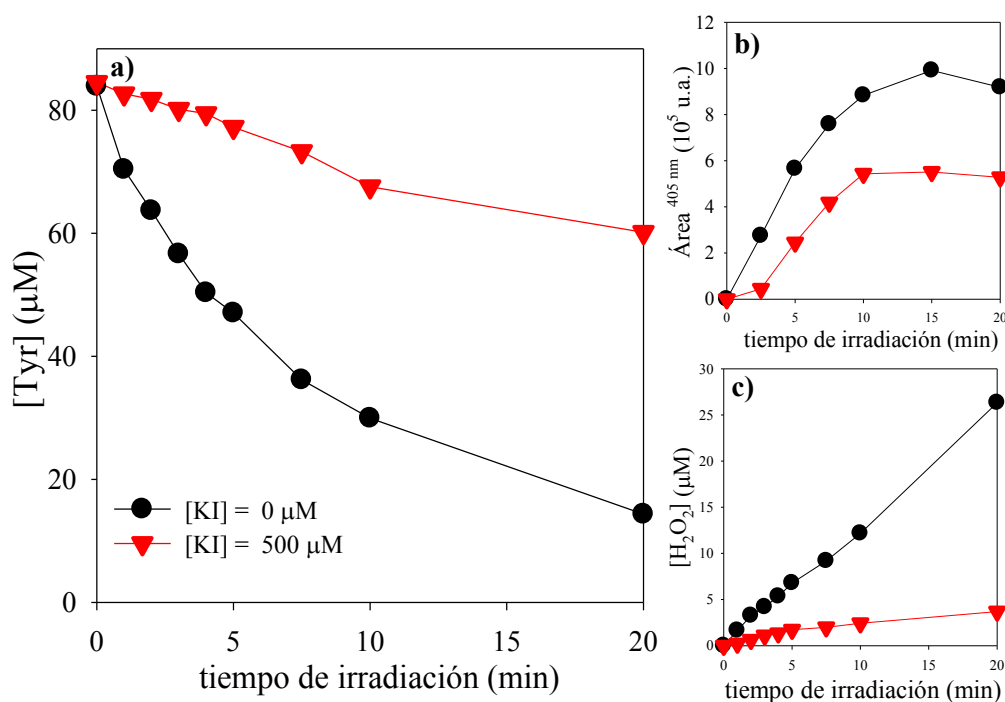


Figura 9.18. (a) Evolución de la concentración de Tyr en presencia y ausencia de KI en función del tiempo de irradiación. (b) Formación de Tyr_2 . (c) Generación H_2O_2 . $[Tyr]_0 = 85 \mu M$; $[Ptr]_0 = 76 \mu M$; $[KI] = 500 \mu M$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

9.3.3 Contribución de la oxidación por 1O_2

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, se puede concluir que el proceso necesita O_2 para que ocurra, que el estado triplete del fotosensibilizador ($^3Ptr^*$) es el responsable del proceso. Se sabe que la Ptr produce eficientemente 1O_2 bajo irradiación UV-A¹⁴, sin embargo con lo obtenido en soluciones saturadas con O_2 (Figura 9.17 (a)), las cuales no son consistentes con un proceso en el cual la Tyr sea oxidada principalmente por 1O_2 . Además, se ha demostrado previamente que las pterinas actúan principalmente a través de procesos iniciados por transferencia de electrones (mecanismo tipo I), incluso en el caso donde el sustrato reacciona rápidamente con 1O_2 ^{12,15}, como la dGMP.

Para confirmar esto, se realizaron experimentos en H_2O y D_2O , dado que el tiempo de vida del 1O_2 en D_2O es mayor que en H_2O (es decir $k_d(H_2O) > k_d(D_2O)$) por un factor de 15^{19,20}. La oxidación fotosensibilizada de Tyr debería ser más rápida en el solvente deuterado si el 1O_2 contribuye significativamente al proceso.

Soluciones equilibradas con aire que contenían Ptr y Tyr en H₂O y D₂O a pH 5,5 /pD 5,4, fueron irradiados bajo las mismas condiciones. La velocidad de consumo de Tyr no se modificó significativamente en soluciones preparadas en D₂O en comparación con H₂O (Figura 9.19), al igual que la formación de los productos.

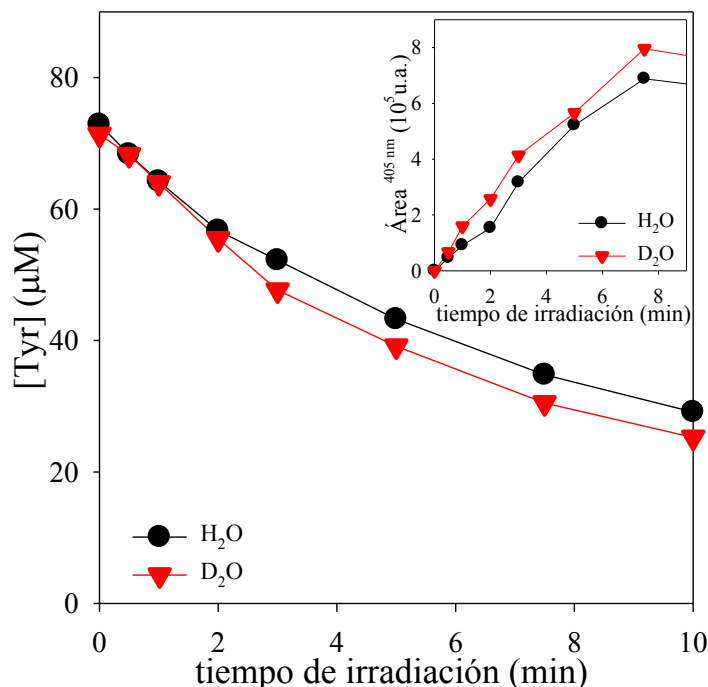


Figura 9.19. Evolución de la concentración de Tyr en función del tiempo de irradiación de soluciones en D₂O y H₂O. Inset: Formación de Tyr₂ en ambos solventes. [Tyr]₀ = 71 μM; [Ptr]₀ = 80 μM; pH 5,5; l = 1 cm.

La oxidación de Tyr y sus derivados por ¹O₂ ha sido estudiada extensivamente¹⁶ y los valores de las constantes de velocidad de la reacción química entre ¹O₂ y Tyr (k_r^{Tyr}) han sido reportados en diferentes estudios ($k_r^{Tyr} < 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pD = 7,0¹⁷; $k_r^{Tyr} = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pD = 8,4¹⁸; $k_r^{Tyr} = 1,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pD = 12¹). Es evidente que el valor de k_r^{Tyr} depende de las condiciones de pH/pD. Bajo nuestras condiciones experimentales k_r^{Tyr} debería ser inferior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La contribución del ¹O₂ en la oxidación fotosensibilizada de Tyr fue estimada considerando un valor de k_r^{Tyr} de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Para calcular la velocidad inicial de la reacción química entre el ¹O₂ y la Tyr, $(d[Tyr]/dt)_{0,calc}$, se utilizó la Ecuación (9.1):

$$\left(\frac{d[Tyr]}{dt} \right)_{0,calc} = -k_r^{Tyr} [^1O_2]_{ss} [Tyr]_0 \quad (9.1)$$

donde $[^1O_2]_{ss}$ es la concentración en estado estacionario de 1O_2 durante la irradiación de la solución que contiene Ptr y Tyr y puede calcularse como se describió en la *Sección 6.7*. Combinando las ecuaciones descritas en el Capítulo 6 con la Ecuación (9.1), podemos estimar $((d[Tyr]/dt)_0)$ para un determinado experimento en estado estacionario (Ecuación (9.2)):

$$\left(\frac{d[Tyr]}{dt} \right)_{0,calc} = -k_r^{Tyr} q_{p,a} \Phi_{\Delta} \tau_{\Delta} [Tyr]_0 \quad (9.2)$$

donde $q_{p,a}$ son los fotones de luz absorbida por la Ptr ($9,1 \times 10^{-6}$ einstein $L^{-1} s^{-1}$), Φ_{Δ} es el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 ($\Phi_{\Delta} = 0,18$ a pH 5,5¹⁴), k_d ($1/\tau_{\Delta}$) es la constante de desactivación unimolecular del 1O_2 la cual es dependiente del solvente¹⁹ ($k_d = 2,6 \times 10^5 s^{-1}$ en H_2O).

Bajo las condiciones experimentales en las que se trabajó, los valores de $((d[Tyr]/dt)_{0,calc})$ calculado con la Ecuación (9.2), fueron menores que la velocidad obtenida experimentalmente, $((d[Tyr]/dt)_{0,exp})$. Por ejemplo, para el experimento mostrado en la Figura 9.17 (a), $((d[Tyr]/dt)_{0,calc})$ fue $0,11 \pm 0,02 \mu M / min$, mientras $((d[Tyr]/dt)_{0,exp})$ fue $5,4 \pm 0,5 \mu M / min$. Este resultado sugiere que, la oxidación química de Tyr por vía 1O_2 no contribuye significativamente.

9.3.4 Irradiación en presencia de SOD

Como se demostró anteriormente, es posible descartar la contribución del 1O_2 al mecanismo de reacción, por lo tanto, debe considerarse un mecanismo iniciado por transferencia de electrones desde el aminoácido a $^3Ptr^*$. Está bien establecido que en un proceso tipo I, el O_2 desactivará fácilmente un radical anión orgánico para producir el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)^{21,22}. El H_2O_2 detectado puede entonces ser el producto de la dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$ en solución acuosa²³.

Se investigó la participación de $O_2^{\bullet-}$ en el mecanismo de reacción, mediante la realización de experimentos a pH 5,5 en presencia de superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la conversión de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2^{2-} ²⁴, siguiendo el procedimiento

descrito en el Capítulo 6, *Sección 6.4.2*. Los resultados muestran un incremento significativo en la velocidad de consumo de Tyr en presencia de SOD (Figura 9.20).

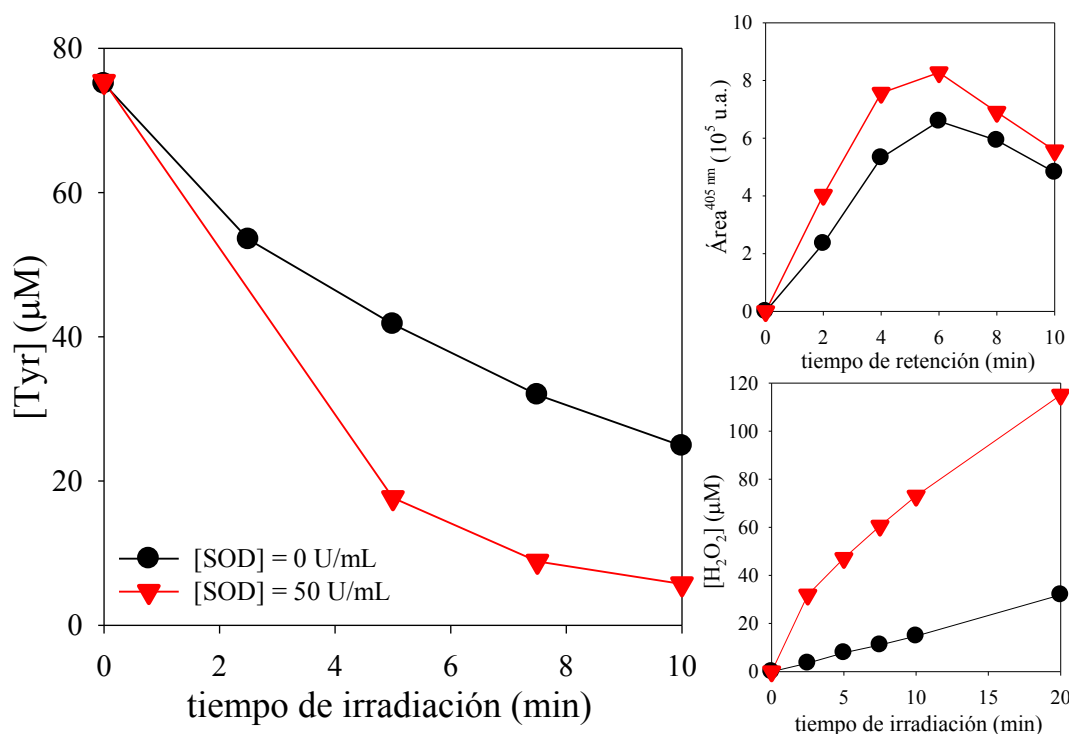


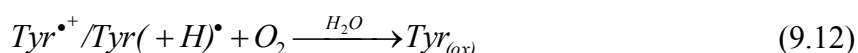
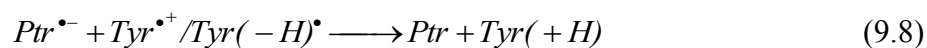
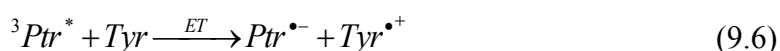
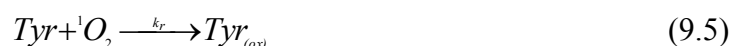
Figura 9.20. (a) Evolución de la concentración de Tyr en función del tiempo de irradiación de soluciones acuosas equilibras con aire en presencia y ausencia de SOD; (b) Formación de Tyr_2 en soluciones acuosas; (c) generación H_2O_2 ; $[\text{Tyr}]_0 = 75 \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 80 \mu\text{M}$; $[\text{SOD}] = 50 \text{ U/mL}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

Este resultado demuestra la participación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en el proceso, debido a que se observa un cambio en la velocidad de consumo de Tyr al agregar SOD. Se puede plantear así la transferencia de electrones entre el estado excitado triplete del fotosensibilizador y el aminoácido en el estado fundamental con la consecuente formación de los pares radicales ($\text{Ptr}^{\bullet-}$ y $\text{Tyr}^{\bullet+}$), posteriormente $\text{Ptr}^{\bullet-}$ reacciona con el oxígeno del medio para dar $\text{O}_2^{\bullet-}$.

9.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

Los resultados presentados en este capítulo demostraron que la Ptr fotosensibiliza la oxidación de Tyr en un proceso en el cual el fotosensibilizador permanece constante. En esta reacción de oxidación no está involucrado el $^1\text{O}_2$, sino que el proceso que predomina principalmente es una transferencia de electrones (mecanismo tipo I). Se generan diferentes productos, entre los que se caracterizan la formación de Tyr_2 , L-

Dopacroma, L-DOPA, además de la incorporación de átomos de O_2 . Con la información obtenida es posible proponer un mecanismo de reacción (Reacciones 9.1 - 9.13).



Después de la excitación de la Ptr y la formación del estado excitado triplete, ${}^3Ptr^*$ (Reacción (9.1) y (9.2)), tres reacciones compiten para la desactivación de este estado excitado: (a) cruce entre sistemas al estado basal (Reacción (9.3)); (b) transferencia de energía al oxígeno molecular, lo que llevaría a la regeneración de Ptr y a la formación de 1O_2 (Reacción (9.4)), el cual puede reaccionar con la Tyr hasta llevar a la oxidación al sustrato (Reacción (9.5)); (c) transferencia de electrones (ET) desde Tyr a ${}^3Ptr^*$ para formar el radical catión Tyr ($Tyr^{\bullet+}$) y el radical anión Ptr ($Ptr^{\bullet-}$) (Reacción (9.6)). En el siguiente paso, el ion radical puede recombinar (Reacción (9.8)). La transferencia de electrones desde $Ptr^{\bullet-}$ al O_2 , regenera a la Ptr y genera $O_2^{\bullet-}$ (Reacción (9.9)). Este radical puede dismutarse con su respectivo ácido conjugado HO_2^{\bullet} para formar H_2O_2 (Reacción (9.10)) o puede recombinarse con $Tyr^{\bullet+}$ para regenerar Tyr (Reacción (9.11)). Finalmente un grupo de procesos, representado esquemáticamente en la

Reacción (9.12) que podrían incluir la ecuación $Tyr^{\bullet+}/Tyr(-H)^{\bullet}$ con O_2 (y eventualmente H_2O_2), llevando a la oxidación de Tyr y al consumo de O_2 . Por otra parte, la Tyr puede dimerizar y contribuye con esto a la oxidación de Tyr (Reacción (9.13)).

Los experimentos realizados en soluciones aireadas indicaron que la velocidad de reacción de la Ptr es insignificante y el consumo de Tyr fue considerable, el cual se inicia con la formación del par radical (Reacción (9.6)). En contraste, en soluciones saturadas de oxígeno, la Reacción (9.4) compite más eficientemente con la Reacción (9.6) y la proporción de $^3Ptr^*$ que reacciona con Tyr es menor, por lo que el proceso es mucho más lento. La ausencia del consumo de Tyr en condiciones anaeróbicas, puede ser explicada con la recombinación de los radicales (Reacción (9.8)).

La reacción en presencia de SOD, lleva a la eliminación de $O_2^{\bullet-}$, por lo que se dificulta la regeneración de Tyr por la Reacción (9.11). Como consecuencia, en presencia de SOD, aumenta la oxidación fotosensibilizada del aminoácido observada experimentalmente (Figura (9.12)), debido que se inhibe una vía de recuperación de $Tyr^{\bullet+}$.

9.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos indicaron que la oxidación fotosensibilizada de Tyr por Ptr, en solución acuosa (pH = 5,5) bajo irradiación UV-A, conlleva a la oxidación del aminoácido, mientras que la concentración del fotosensibilizador no cambia significativamente. Durante este proceso, el oxígeno disuelto se consume y hay generación H_2O_2 . Por otro lado, la Tyr no se consume en ausencia de O_2 .

El análisis del mecanismo indica que la reacción por la cual la Ptr fotosensibiliza la oxidación de Tyr, no involucra al 1O_2 , pero sí, un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones. En este mecanismo la excitación de la Ptr es seguida por una transferencia de electrones del aminoácido al estado triplete de la Ptr, llevando a la formación del correspondiente ion radical ($Ptr^{\bullet-}$ y $Tyr^{\bullet+}$). En el siguiente paso de reacción, la transferencia de electrones de $Ptr^{\bullet-}$ al O_2 regenera la Ptr y forma el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual puede dismutarse con su respectivo ácido conjugado (HO_2^{\bullet}) para formar H_2O_2 o reaccionar con $Tyr^{\bullet+}$ para regenerar a Tyr. El análisis de los

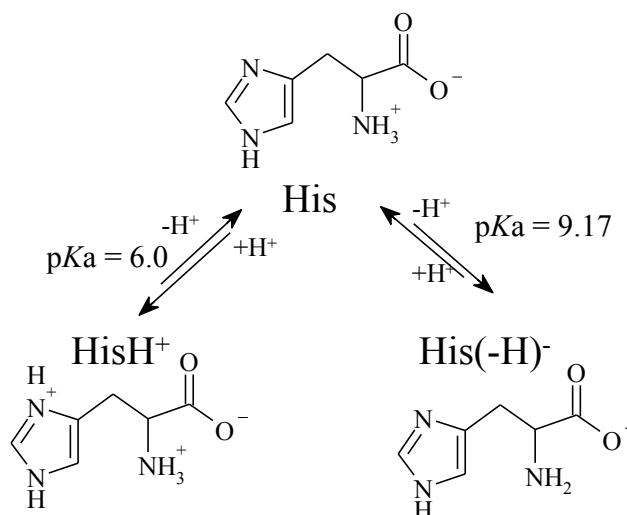
fotoproductos confirmó la generación de diferentes compuestos de oxidación (DOPA y L-Dopacroma), y productos diméricos tal como Tyr₂ el cual está involucrado en el *crosslinking* de proteínas.

Bibliografía

1. Criado, S.; Soltermann, J. M.; Marioli, J. M.; García, N. A. ; *Photochem. Photobiol.* **68**, 453–458 (1998).
2. Wright, A.; Bubb, W. A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J. ; *Photochem. Photobiol.* **76**, 35–46 (2002).
3. Rabgaoui, N.; Slaoui-Hasnaoui, A.; Torreilles, J. ; *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 5179–529 (1993).
4. Malencik, D. A.; Anderson, S. R. ; *Biochemistry* **35**, 4375–4386 (1996).
5. Amadó, R.; Aeschbach, R.; Neukom, H. ; *Methods Enzym.* **107**, 377–388 (1984).
6. Monópoli, V. D.; Thomas, A. H.; Caparelli, A. L. . ; *Int. J. Chem. Kinet* **32**, 231 – 237 (2000).
7. Dántola, M. L.; Gojanovich, A. D.; Thomas, A. H. ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 568–572 (2012).
8. Harms, G. S., S. W. Pauls, J. F. H. and C. K. J. ; *J. Fluoresc.* **7**, 283–292 (1997).
9. Huggins, T. G., M. C. Wells-Knecht, N. A. Detorie, J. W. Baynes Thorpe, and S. R. ; *J. Biol. Chem.* ; **268**, 12341–12347 (1993).
10. Heinecke, J. W., W. Li, G. A. F. and J. A. G. ; *J. Clin. Invest.* **91**, 2866–2872 (1993).
11. Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Braun, A. M.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. . ; *Org. Biomol. Chem* **5**, 2792–2799 (2007).
12. Petroselli, G.; Dantola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; and Thomas, A. H. ; *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3001–3011 (2008).
13. Denofrio, M. P.; Ogilby, P. R.; Thomas, A. H.; Lorente, C. . No Title. *Photochem. Photobiol. Sci.* **13**, 1058–1065 (2014).
14. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Capparelli,; Martinez, G.; Braun, A. M. and O. E. . ; *Photochem. Photobiol Sci* **2**, 245–250 (2003).
15. Thomas, A. H. *et al.* ; *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 467–475 (2013).
16. Criado, S.; Soltermann, J. M.; García, N. A. No Title. *Amino Acids* **8**, 367–377 (1995).
17. Posadaz, A.; Biasutti, A.; Casale, C.; Sanz, J.; Amant-Guerri, F. and Garcia, N. A. . No Title. *Photochem. Photobiol.* **80**, 132–138 (2004).
18. Matheson, I. B. C. and J. L. No Title. *Photochem. Photobiol.* **29**, 879–881 (1978).
19. Wilkinson, F.; Helman, H. P.; and Ross, A. B. . ; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 663–1021 (1995).
20. Ogilby, P. R. and Foote, C. S. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3423–3430 (1983).
21. Hodgson, E. K. and Fridovich, I. . ; *Photochem. Photobiol.* **18**, 451–455 (1973).
22. Eriksen, J.; Foote, C. S. and Parker, T. L. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 6455–6456 (1977).
23. Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L. and Ross, A. B. . ; *J. Phys. Chem.* **14**, 1041–1100 (1985).
24. Fridovich, I. ; *Photochem. Photobiol.* **28**, 733–741 (1978).

Capítulo 10: Degradación fotosensibilizada de histidina libre

El objetivo de este capítulo es evaluar el efecto sobre la histidina (His) en los procesos fotosensibilizados inducidos por Ptr. Se ha demostrado que la His, en solución acuosa, posee tres formas ácido-base en el rango de pH 5-11, una forma protonada (HisH^+), una forma neutra (His) y una forma aniónica ($\text{His}(-\text{H})^-$), con valores de pK_a de 6,0 y 9,2 (Esquema 10.1).



Esquema 10.1. Estructura molecular de la His con sus formas ácido-base en el rango de pH 5-11.

Bajo irradiación directa con luz UV-A, la His no genera ningún cambio químico en su estructura, pero se ha demostrado que los procesos fotosensibilizados conllevan a la oxidación del aminoácido¹. El mecanismo de degradación de la His es fuertemente dependiente del pH^{2,3}. En el caso de la reacción con $^1\text{O}_2$, solamente son reactivas la forma neutra y la forma aniónica^{4,2,5}, mientras que la forma protonada de la His puede ser degradada a través de un mecanismo tipo I. Como se mencionó en el Capítulo 5, la velocidad de la reacción química de la His por $^1\text{O}_2$ depende del pH y además la forma alcalina y neutra tiene constantes de reacción mayor que la forma ácida.

Teniendo en cuenta lo anterior se eligieron dos condiciones de pH para realizar el estudio de fotosensibilización de His por Ptr. Específicamente la condición en medio ácido fue $\text{pH} \approx 5,5$, en donde predomina la forma protonada y neutra de la His; En medio alcalino, se trabajó a $\text{pH} \approx 10,5$, donde predomina la forma aniónica del aminoácido. En el caso del fotosensibilizador a pH 5,5 predomina la forma ácida y a pH 10,5 la forma alcalina (*Sección 2.2*).

Las soluciones irradiadas fueron analizadas por espectroscopía *UV-Vis* y por HPLC-PDA para cuantificar el consumo de los sustratos y la formación de los productos. Para la caracterización de los productos generados en la reacción fotosensibilizada se realizaron pruebas de UPLC-MS. El análisis de los resultados se enfocó principalmente en dilucidar el mecanismo de reacción y en la formación de los productos en función del pH.

10.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar His.

Se analizaron soluciones acuosas que contenían Ptr e His irradiadas durante diferentes periodos de tiempo con luz UV-A (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*). Las soluciones irradiadas fueron analizadas de una forma análoga a la descrita en el capítulo anterior. Como se puede observar en la Figura 10.1, solo la Ptr puede ser excitada bajo estas condiciones experimentales, debido que, a la longitud de onda de irradiación, el aminoácido no absorbe.

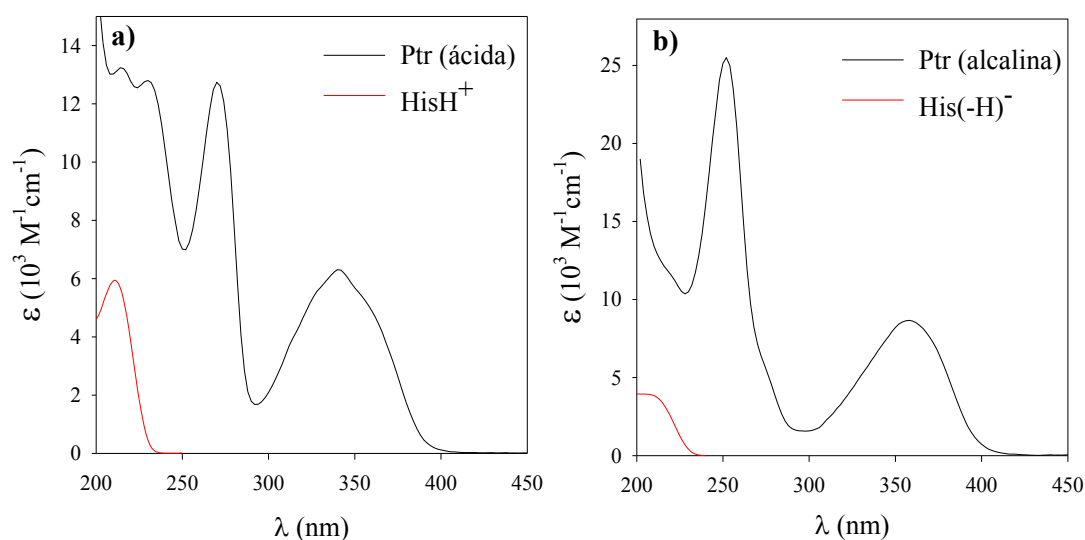


Figura 10.1. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Ptr e His. (a) pH = 5,5, (b) pH = 10,5.

10.1.1 Análisis espectroscópico

En ambas condiciones de pH, se observaron cambios espectrales en función del tiempo de irradiación (Figura 10.2), indicando así que existen cambios químicos como consecuencia de la reacción. Específicamente en medio ácido se observó una disminución de la absorción a longitudes de onda bajas, donde absorbe la His, con un

punto isobéptico aproximadamente en 225 nm y un aumento de la absorbancia a partir de este valor y hasta alrededor de 320 nm. Por otra parte, en medio alcalino se observó también una disminución de la absorbancia a longitudes de onda bajas His.

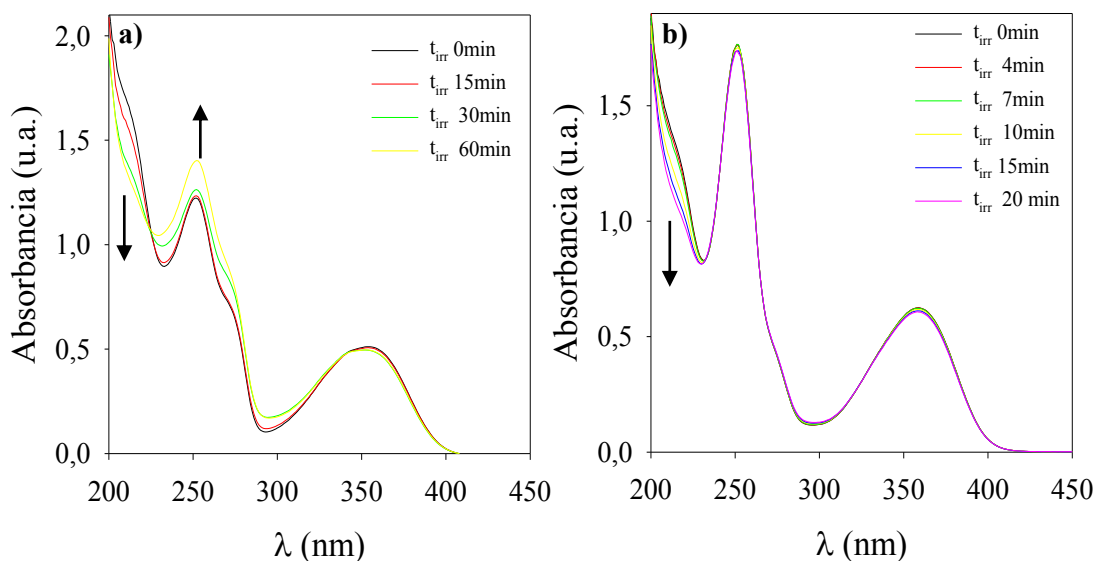


Figura 10.2. Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas de His y Ptr equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación: **(a)** pH 5,5; **(b)** pH 10,5; $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[His]_0 = 100 \mu M$; pH 5,5; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

10.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Las soluciones aireadas, que contenían Ptr e His, se irradiaron por diferentes periodos de tiempo en ambas condiciones de pH. Estas muestras irradiadas se analizaron por HPLC-PDA, para cuantificar el consumo de los reactivos e investigar la formación de los productos, utilizando la Fase Móvil I y la columna Synergi Polar RP (Sección 7.1.2). En la Figura 10.3 se presentan los cromatogramas correspondientes a la reacción en medio ácido, analizados a 220 nm. Antes de la irradiación aparecen dos picos, que corresponden a la His ($t_r = 4,46 \text{ min}$) y la Ptr ($t_r = 12,28 \text{ min}$). La identificación de cada uno se realizó haciendo una comparación con los cromatogramas obtenidos inyectando los correspondientes patrones. El análisis de las soluciones irradiadas mostró una disminución del pico que corresponde a la His y la aparición de un nuevo pico con un t_r de 7,09 min, cuya área aumentó con el tiempo de irradiación (Figura 10.3). El espectro de absorción de este producto tiene un máximo a 250 nm, lo que coincide con lo observado en los cambios espectrales. El pico de la Ptr permaneció constante en el tiempo que duró la irradiación. Estos resultados confirman que la Ptr es capaz de fotosensibilizar a la His.

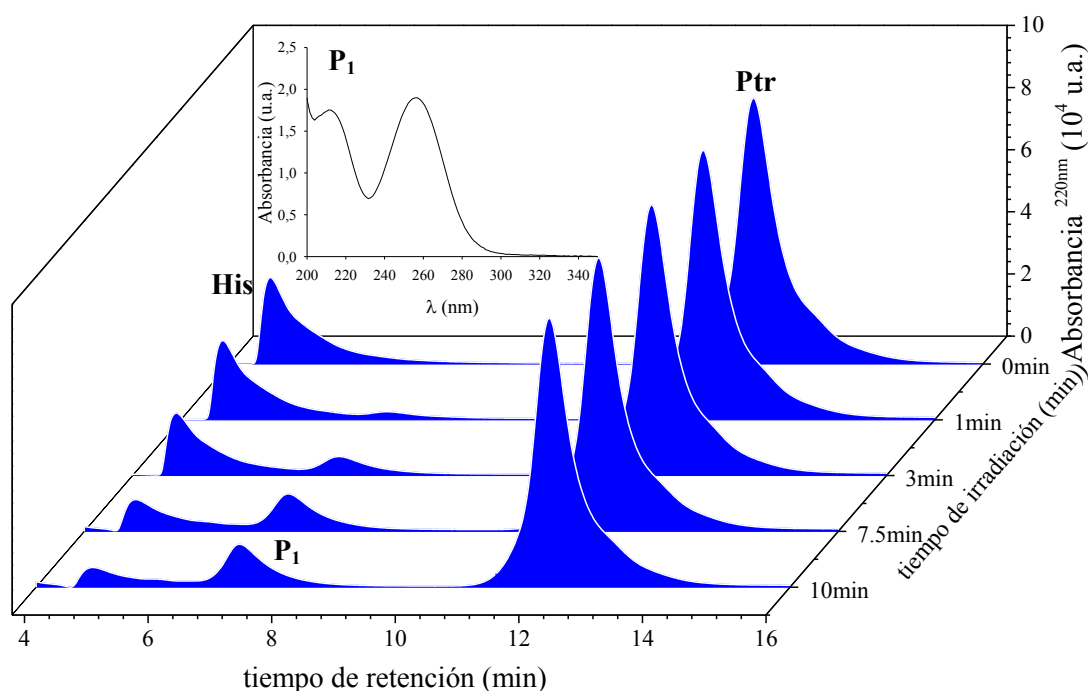


Figura 10.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr e His equilibradas con aire. Inset: Espectro de absorción de P_1 , $t_r = 7,06$ min. $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[His]_0 = 100 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,46$; $\lambda_{\text{ana}} = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

Por otra parte, los cromatogramas observados en medio alcalino se presentan en la Figura 10.4. En este caso también se ve una disminución en el área del pico que corresponde a la His con el tiempo de irradiación, mientras la Ptr permanece constante. En esta condición de pH se detectó un producto en el tiempo de irradiación más largo, el cual tiene una baja intensidad y el espectro de absorción muestra máximos en 250 nm y 340 nm aproximadamente. Más adelante en la sección de identificación de productos se ampliará el estudio de los fotoproductos de la reacción.

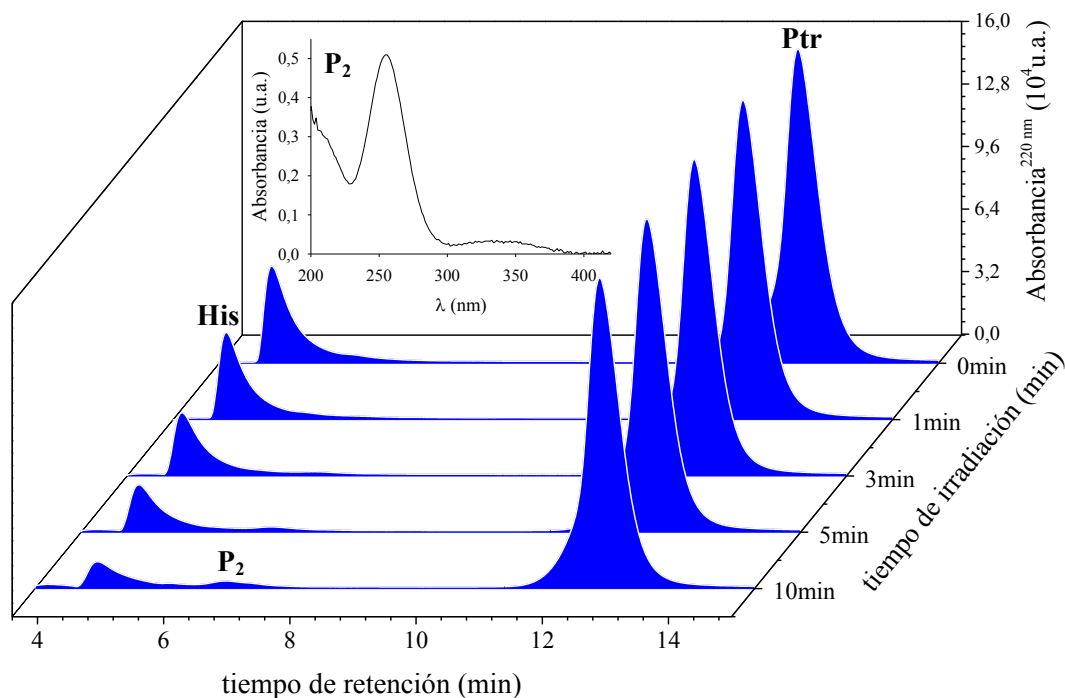


Figura 10.4. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr e His equilibradas con aire. Inset: Espectro de absorción P_2 con $t_r = 7,03$ min. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[His]_0 = 100 \mu M$; pH = 10,54; $\lambda_{irr} = 350$ nm; $l = 1$ cm; $\lambda_{ana} = 220$ nm;

Los perfiles de concentración de la His y Ptr en función del tiempo de irradiación, mostraron el descenso en la concentración del aminoácido en ambas condiciones de pH (Figura 10.5). En el caso del medio ácido la velocidad inicial de consumo de His ($-\partial[His]/\partial t)_0 = 0,056 \pm 0,003 \mu M/s$, mientras que para medio alcalino ($-\partial[His]/\partial t)_0 = 0,19 \pm 0,02 \mu M/s$, lo que demuestra que el consumo de His a pH alcalino es aproximadamente 3 veces más rápido que a pH ácido. Además en ambos casos el consumo de la Ptr fue totalmente despreciable durante el tiempo que duró el experimento.

Para investigar la producción de H_2O_2 , las muestras irradiadas se analizaron utilizando la técnica descrita en el Capítulo 7. Los resultados obtenidos (Figura 10.5), mostraron la generación de H_2O_2 como función del tiempo de irradiación. En medio ácido, esta especie reactiva del oxígeno es generada con una velocidad inicial $(\partial[H_2O_2]/\partial t)_0 = 0,057 \pm 0,004 \mu M/s$ muy similar a la velocidad de consumo de His en las mismas condiciones, es decir, por cada molécula de His que es consumida se genera la misma cantidad H_2O_2 . En medio alcalino, la velocidad inicial de producción de H_2O_2 fue $(\partial[H_2O_2]/\partial t)_0 = 0,016 \pm 0,002 \mu M/s$, lo cual es 15 veces menor en comparación con la velocidad de consumo de His en este medio. Este resultado demuestra que los procesos

de oxidación de la His en ambos medios son diferentes y pueden darse por mecanismos distintos.

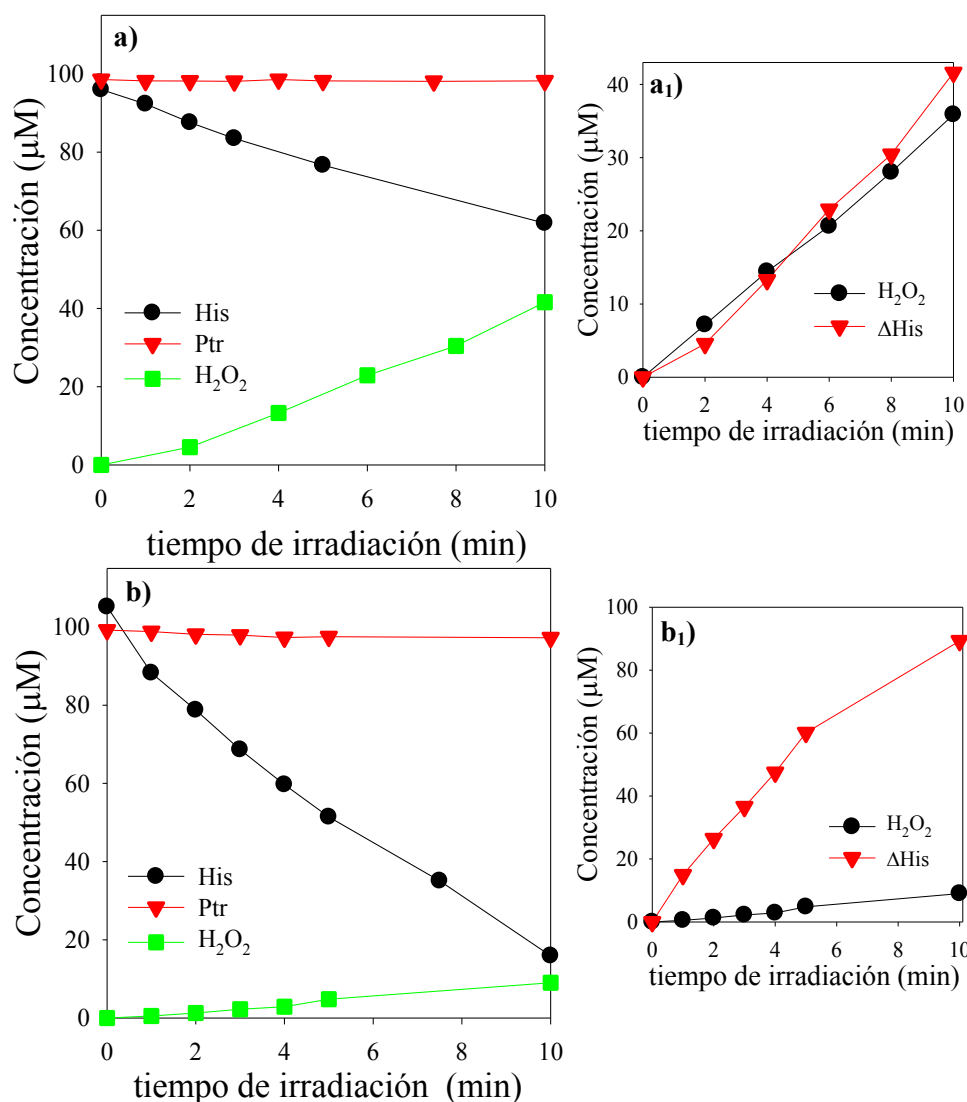


Figura 10.5. Evolución de las concentraciones de His, Ptr y H_2O_2 en solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A en función del tiempo de irradiación. **(a)** pH 5,46. **(b)** pH 10,54. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[His]_0 \sim 100 \mu M$; $\lambda_{ana}(His) = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{ana}(Ptr) = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

10.1.3. Medida electroquímica de la concentración de O_2

Se realizaron experimentos en estado estacionario con el equipo descrito en Sección 7.1.6 para determinar la concentración de O_2 en función del tiempo de irradiación de soluciones que contenían His y Ptr en ambas condiciones de pH.

Se realizaron controles en ausencia de His, observando que el consumo de oxígeno fue despreciable en comparación con el consumo de la misma especie en presencia del aminoácido (Figura 10.6). Por otra parte, el consumo de O_2 es mayor en medio alcalino

(Figura 10.6 (b)) que en medio ácido (Figura 10.6 (a)), lo cual coincide con el consumo observado anteriormente por cromatografía. Con este resultado podemos confirmar que los procesos observados son debidos a un proceso de oxidación fotoinducida.

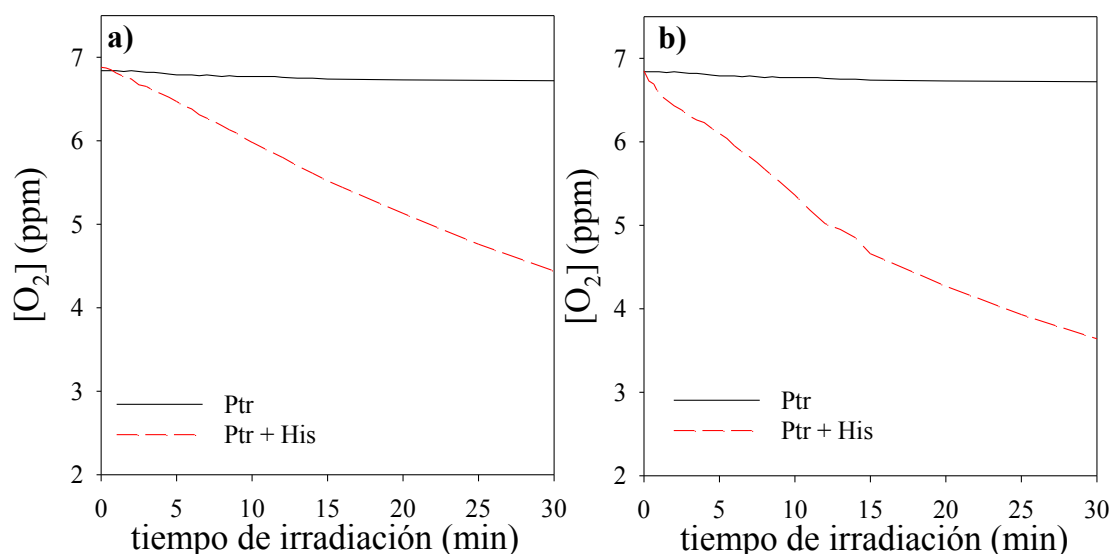


Figura 10.6. Evolución de la concentración de O_2 en soluciones irradiadas de Ptr en ausencia y presencia de His como función del tiempo. **(a)** pH = 5,48, **(b)** 10,59. $[His]_0 = 500 \mu M$; $[Ptr]_0 = 100 \mu M$.

10.1.4 Controles

Se realizaron los controles experimentales, similares a los descritos para el estudio de la fotosensibilización de Tyr (Capítulo 9), con el fin de descartar que el consumo de His se deba a una reacción térmica ó fotólisis del aminoácido mismo. Se midieron los espectros de absorción y se cuantificaron por HPLC-PDA las concentraciones de los reactivos de soluciones acuosas de His y Ptr, conservadas en oscuridad. Los resultados indicaron que no existían cambios apreciables en los espectros de absorción ni en las concentraciones, en ambas condiciones de pH, descartando así la existencia de una reacción térmica entre la His y Ptr.

El segundo control consistió en irradiar soluciones de His en ambas condiciones de pH a 350 nm, en ausencia del fotosensibilizador. Se tomaron los espectros de absorción y se cuantificó la concentración de His por HPLC-PDA. Los espectros de absorción en diferentes tiempos de irradiación y los perfiles mostraron que no existen cambios apreciables, lo que indica que durante este tiempo no hay ninguna modificación química por irradiación de His. Este resultado en realidad es obvio ya que a esta longitud de onda que se está irradiando el aminoácido no absorbe.

10.2 Análisis de fotoproductos

Como se mencionó en las secciones anteriores, la fotosensibilización de His por Ptr, conlleva a la oxidación del aminoácido y a la formación de al menos dos productos, uno en cada condición de pH. La caracterización de estos productos se realizó con espectrometría de masa.

10.2.1 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

La identificación de los productos generados en la reacción fotosensibilizada de Ptr e His en medio ácido y alcalino, se realizó utilizando el equipo UPLC acoplado a un espectrómetro de masa (*Sección 7.1.3*). Los espectros de masas, se registraron en modo positivo y negativo (ESI^+ y ESI^-), pero las mejores señales se observaron en el modo ESI^+ .

La fórmula molecular de la His es $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ y su peso molecular es 155,06 Da. En los cromatogramas obtenidos para las soluciones antes de la irradiación en ambas condiciones de pH, se observó la aparición de dos picos con t_r de 1,35 min y 4,5min correspondientes a la His y Ptr respectivamente. En la Figura 10.7 se presentan los espectros MS ESI^+ de los picos observados en los cromatogramas para la solución sin irradiar. En el pico con t_r de 1,35 min, se detectó el ion molecular intacto de His ($[\text{M} + \text{H}]^+ = [\text{His} + \text{H}]^+$) con una relación $m/z = 156,0694$ Da. Con respecto al pico con t_r de 4,5 min, en el espectro de MS se detectó el ion molecular intacto de Ptr ($[\text{M} + \text{H}]^+ = [\text{Ptr} + \text{H}]^+$) a $m/z = 164,0560$ Da y además el ion molecular más K^+ ($[\text{M} + \text{K}]^+ = [\text{Ptr} + \text{K}]^+$) a $m/z = 202,0129$ Da.

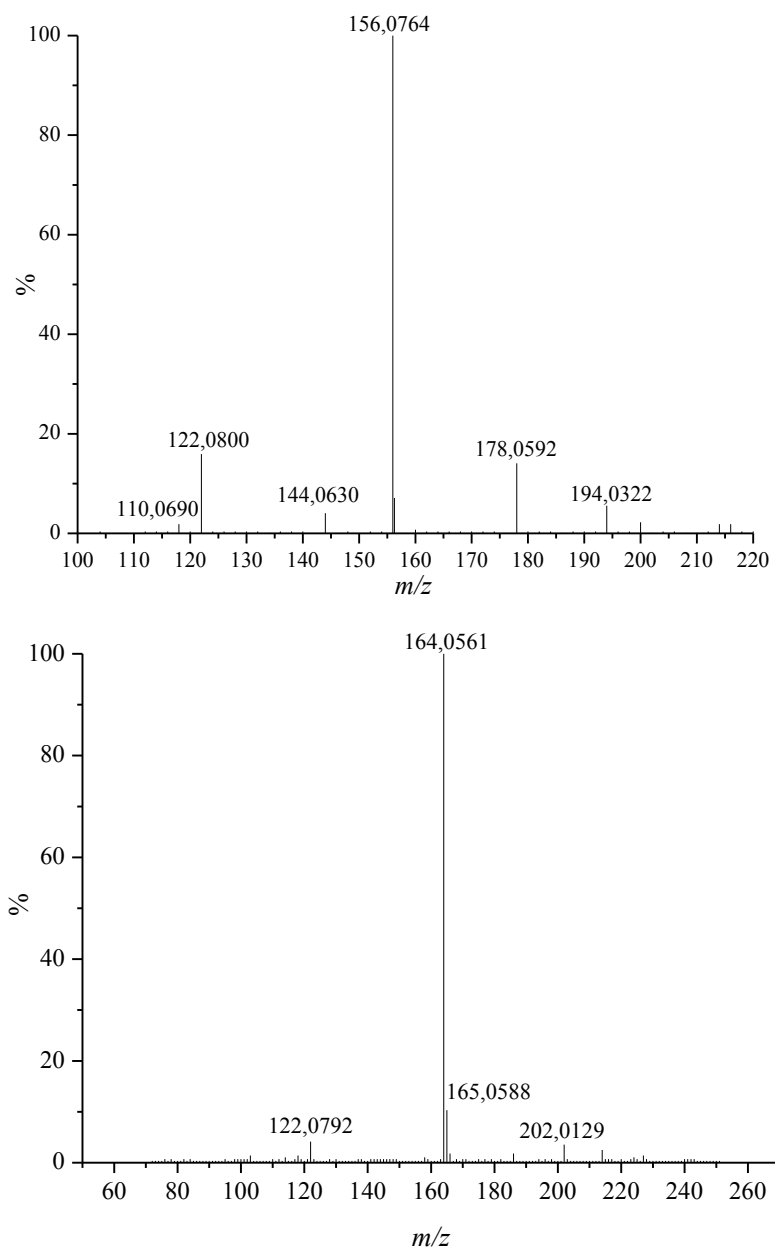


Figura 10.7. Espectros MS de los picos con t_r 1,35 min y 4,5 min correspondientes a His y Ptr, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{His}]_0 = 100 \mu\text{M}$; Modo ESI^+ ; Voltaje = 50 V.

10.2.1 Medio ácido

Haciendo un análisis similar de las soluciones irradiadas, a pH 5,5 se observó un producto con t_r mayor que la His (1,73 min), el cual aumenta en función del tiempo de irradiación. El espectro de masas de este producto presentó un ion molecular con m/z 111,0525 Da, además se identificó la incorporación de una molécula de agua a este ion (m/z 129,0635 Da) (Figura 10.8). Los reportes hechos previamente sobre los productos

de oxidación de la His (Capítulo 5), no coinciden con este patrón de masas. Hasta el momento no se ha identificado este producto.

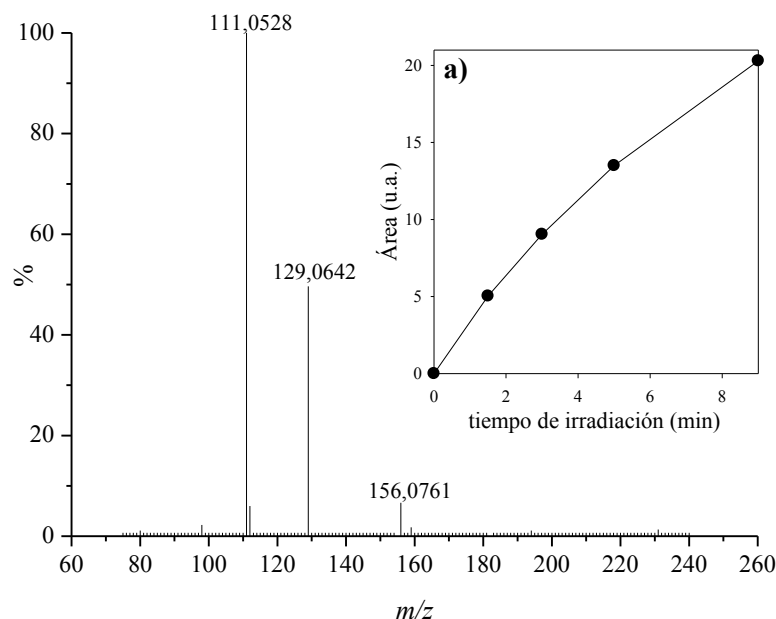


Figura 10.8. Espectro de masas del producto generado en medio ácido de soluciones irradiadas de His en presencia de Ptr aireadas. **(a)** Evolución del producto en función del tiempo de irradiación ($t_r = 1,73$ min). [His]= 100 μ M; [Ptr]= 100 μ M; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

10.2.2 Medio alcalino

Las soluciones aireadas de Ptr e His a pH 10,5 irradiadas por 9 min, mostraron la formación de dos productos. El espectro de masas, del producto denominado P_1' con $t_r = 1,2$ min, es presentado en la Figura 10.9, donde se identificó el ion molecular con m/z 188,0661 Da. Este valor de m/z detectado, corresponde a la incorporación de dos átomos de oxígeno a la molécula de His. Como se mencionó anteriormente uno de los productos reportados para la oxidación de His es generado por uno o más endoperóxidos inestables que conlleva al cierre del anillo de forma intramolecular¹ (Capítulo 5). Los reportes indican que dicho producto tiene como fórmula molecular $C_6H_8N_3O_4$ y el peso molecular es 187,065 Da. Estos reportes coinciden con el producto denominado P_1' , generado en la reacción fotosensibilizada de His por Ptr. Además en el espectro, también se puede observar la formación de pesos moleculares mayores, que coinciden con la dimerización de His oxidados.

Se registraron los cromatogramas en modo MS, representando la intensidad producida por los iones que llegan al detector a un valor determinado de m/z en función del t_r . En la Figura 10.9 (a), se presenta el cromatograma en modo MS para m/z 188,0661 Da. El

cromatograma mostró un único pico, lo cual implica que se forma un solo producto con ese peso molecular. La integración de este pico indico que este producto aumentaba en función del tiempo de irradiación.

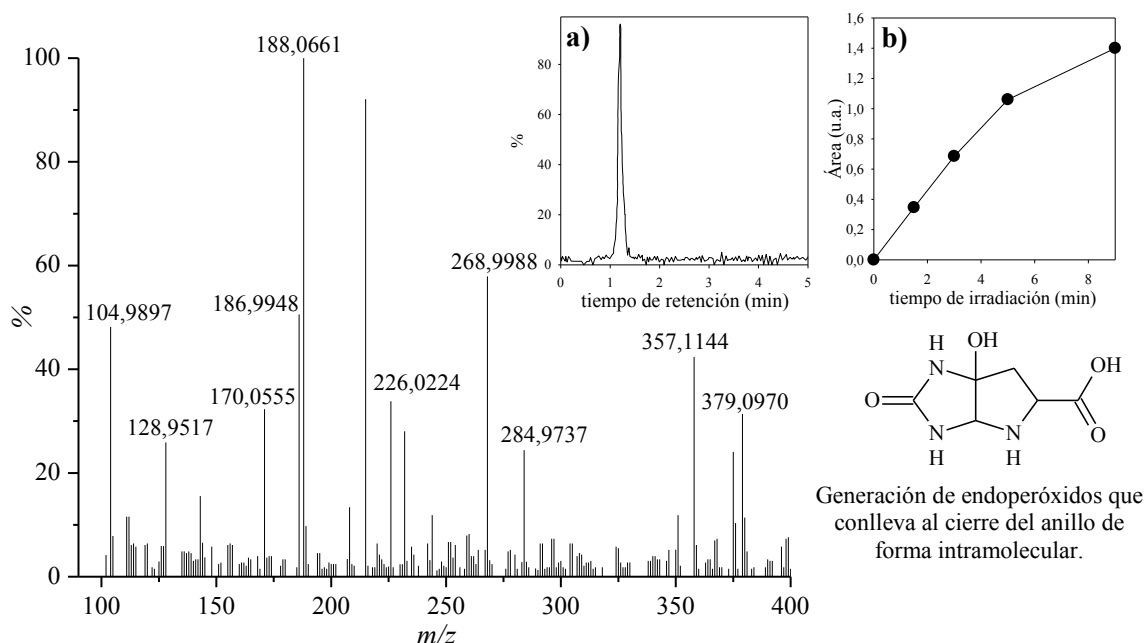


Figura 10.9. Espectro de masas de P_1' obtenido al irradiar soluciones de His en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 188,06 Da. (b) Evolución del producto (P_1') en función del tiempo de irradiación. [His]= 100 μ M; [Ptr]= 100 μ M; pH= 10,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Por otra parte, se ha reportado que la His puede someterse a una reacción de dimerización que puede generar *cross-linking* en las proteínas¹. La fórmula molecular de los dímeros de His es $C_{12}H_{16}N_6O_4$ y tiene peso molecular 308,07 Da. En las soluciones irradiadas se observó la aparición de valores mayores que la His correspondientes a m/z 341,1227 Da y 357,1152 Da, los cuales coinciden con los pesos moleculares de la formación de dímeros oxidados (Figura 10.10). En el caso de m/z 341,1227 Da corresponde a la formación de los dímeros con incorporación de dos molécula de oxígeno a la His. Por otra parte, la m/z de 357,1152 Da correspondería a la dimerización con incorporación de tres átomos de O a la His.

Es importante resaltar que los productos identificados en ambas condiciones de pH, fueron diferentes, lo que puede dar una primera evidencia que el mecanismo de reacción en ambas medios es diferente.

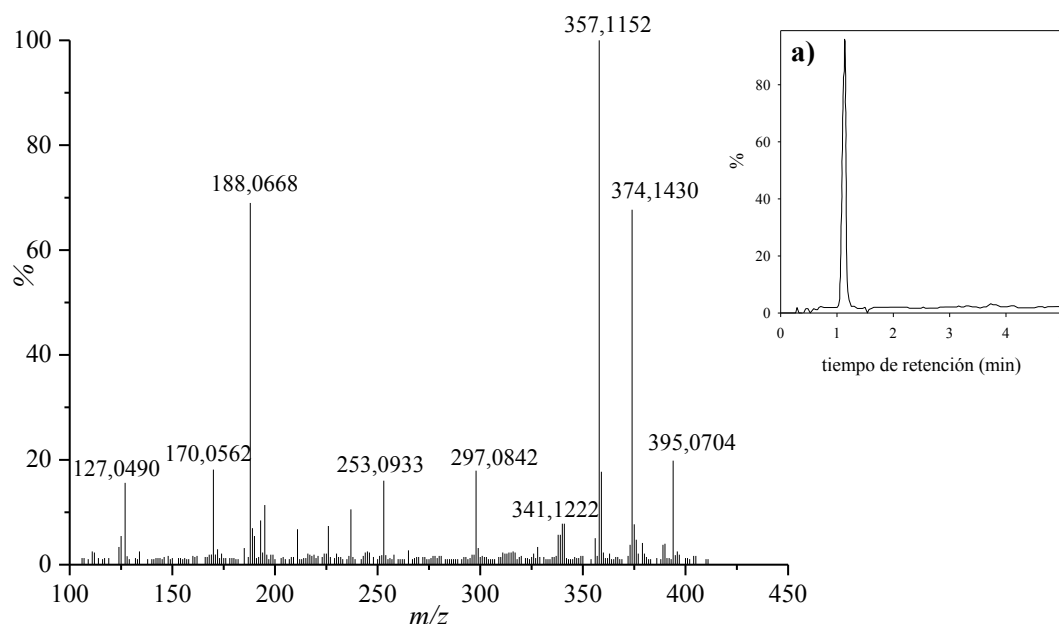


Figura 10.10. Espectro de masas de los dímeros oxidados de His de las soluciones irradiadas equilibradas con aire. **(a)** Cromatograma de masas obtenido con el detector fijo en m/z 357,11 Da. [His]= 100 μ M; [Ptr]= 100 μ M; pH= 10,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

10.3. Determinación del mecanismo de reacción

10.3.1 Rol del Oxígeno

Las soluciones irradiadas, previamente burbujeadas con Ar y saturadas con O_2 , se analizaron por HPLC-PDA. Los resultados se presentan en la Figura 10.11, donde se observa que la His no cambió su concentración en ausencia de O_2 para ambas condiciones de pH, y consecuentemente no se observó la generación de productos.

En medio ácido, se podría hacer un razonamiento similar al presentado en los experimentos equivalentes llevados a cabo con Tyr (Capítulo 9). Los resultados indican que la velocidad de consumo de His ($-\partial[\text{His}]/\partial t$) = 0.015 ± 0.004 μ M/s es menor en las soluciones saturadas con O_2 , en comparación con las soluciones en aire ($-\partial[\text{His}]/\partial t$)₀ = 0.059 ± 0.002 μ M/s, reflejándose de forma similar en la generación de los productos. Este resultado sugiere que el O_2 desactiva el estado triplete del fotosensibilizador y por lo tanto inhibe el consumo del sustrato, además puede indicar que la vía de degradación predominante en medio ácido se da principalmente a través de un mecanismo tipo I.

Por otra parte, el cambio en la concentración de His en soluciones saturadas con O_2 a pH alcalino fue ($-\partial[\text{His}]/\partial t$)₀ = 0.139 ± 0.009 μ M/s, el cual es un valor comparable con

las soluciones aireadas $(-\partial[\text{His}]/\partial t)_0 = 0.18 \pm 0.01 \mu\text{M/s}$, lo que se puede ver con mayor claridad en la Figura 10.11 (b). Este resultado sugiere que el $^1\text{O}_2$ podría ser la principal especie oxidante, en estas condiciones de pH, siempre y cuando el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ) no esté afectado por la variación de la concentración de O_2 . Por lo tanto, se puede proponer que la degradación de la His en medio alcalino se da a través de un mecanismo tipo II.

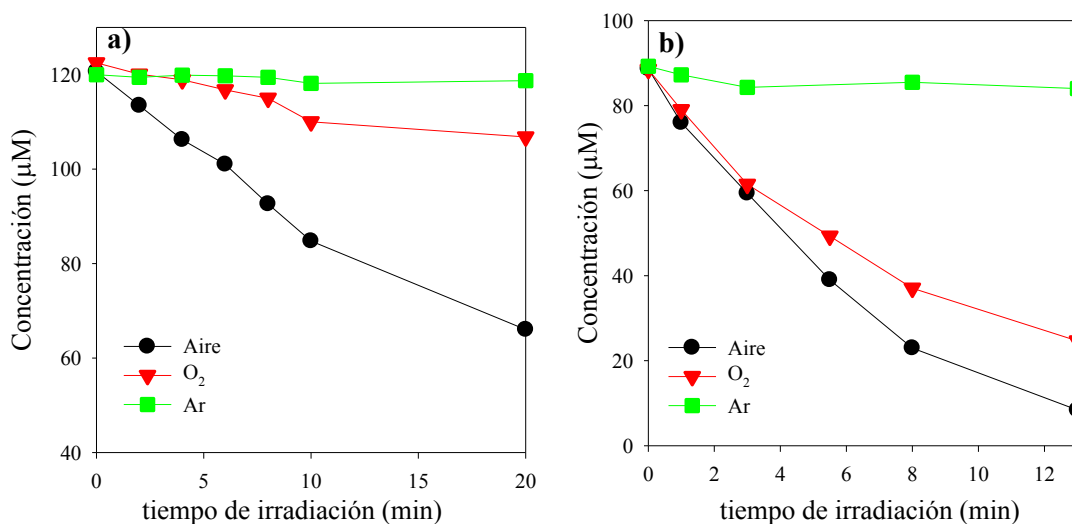


Figura 10.11. Evolución de la concentración de His en soluciones acuosas equilibradas con aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación. **(a)** pH 5,46; **(b)** pH 10,54. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{His}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

10.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Como se ha mencionado anteriormente, es posible que los estados tripletes del fotosensibilizador estén involucrados en la reacción. Para confirmar esto, se realizaron experimentos comparativos en presencia y en ausencia de KI, como se explicó en la Sección 9.3.2. En la Figura 10.12 se presentan los perfiles de concentración de las soluciones aireadas en presencia y en ausencia de KI en ambas condiciones de pH. La presencia del desactivador conlleva a una inhibición en la velocidad de consumo de His, en comparación con las soluciones en donde no está presente KI, medidas en idénticas condiciones. Por otra parte la generación de los productos también fue inhibida por la presencia del desactivador. Teniendo en cuenta que, a la concentración trabajada el KI solo desactiva los estados excitados tripletes del fotosensibilizador⁶, la inhibición

observada para la concentración de His, en ambas condiciones de pH en presencia del apagador, sugiere fuertemente la participación del $^3P_{tr}^*$ en la reacción.

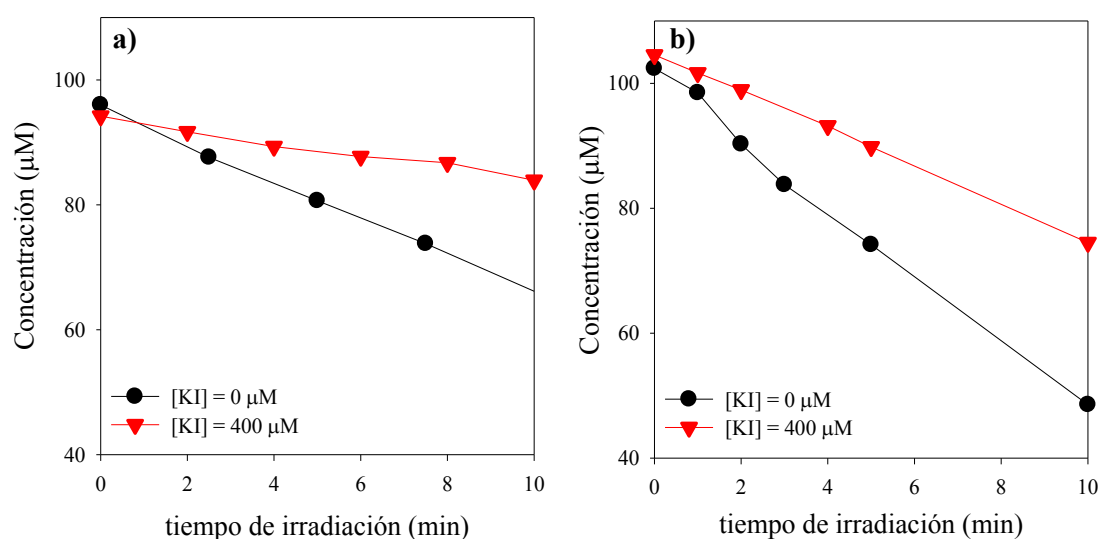


Figura 10.12. Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en presencia y ausencia de KI, en función del tiempo de irradiación. **(a)** pH 5,61. **(b)** pH 10,59. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[His]_0 \sim 100 \mu M$; $[KI] = 400 \mu M$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

10.3.3 Contribución de la oxidación por 1O_2

En la Figura 10.13, se muestran los perfiles de concentración obtenidos de las soluciones irradiadas en H_2O y D_2O . Los resultados indicaron que en medio ácido la velocidad de consumo de la His es similar en ambos solventes, por lo tanto en este caso se pudo decir que el mecanismo tipo II no contribuye significativamente (Figura 10.13 (a)). Por otra parte, en medio alcalino, el consumo del aminoácido en el solvente deuterado, mostró una aceleración muy importante, sugiriendo que el 1O_2 está involucrado en la oxidación del sustrato (Figura 10.13 (b)).

Estos resultados coinciden con lo obtenido en la Sección 10.3.1, confirmando así que la reacción fotosensibilizada en medio ácido se da por un mecanismo tipo I y en medio alcalino el mecanismo predominante es tipo II.

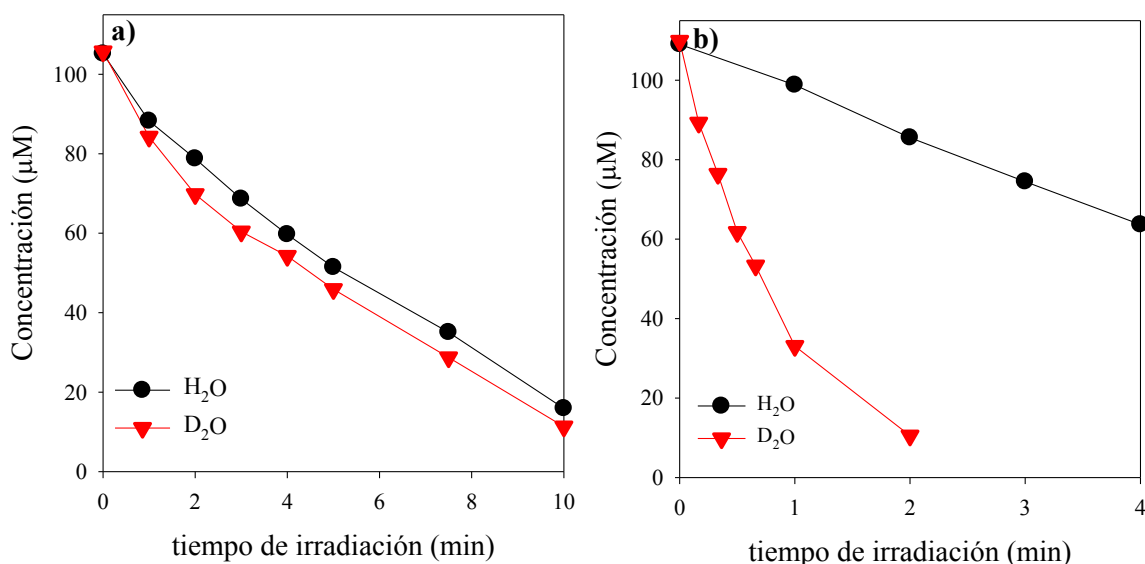


Figura 10.13. Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación, en H_2O y D_2O . **(a)** pH 5,37 / pD 5,17; **(b)** pH 10,55 / pD 10,05; $[\text{Ptr}]_0 \sim 100 \mu\text{M}$; $[\text{His}]_0 \sim 100 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

Previamente se ha estudiado la reacción de His por $^1\text{O}_2$ y los valores de las constantes de reacción química demuestran que la fotooxidación del aminoácido es mayor en medio alcalino³, con un valor de velocidad aproximado de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Capítulo 5). La contribución del $^1\text{O}_2$ en la oxidación fotosensibilizada de His fue estimada considerando un valor de $k_r^{\text{His}} 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en condiciones alcalinas y $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en medio ácido³. Para calcular la velocidad inicial de la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ y la His $(d[\text{His}]/dt)_{0,\text{calc}}$ se utilizó la Ecuación (10.1):

$$\left(\frac{\partial[\text{His}]}{\partial t} \right)_{0,\text{calc}} = -k_r^{\text{His}} [^1\text{O}_2]_{ss} [\text{His}]_0 \quad (10.1)$$

donde $[^1\text{O}_2]_{ss}$ es la concentración en estado estacionario de $^1\text{O}_2$ durante la irradiación de la solución que contiene Ptr e His y puede calcularse como se explicó en el Capítulo 6.

Los resultados obtenidos de $(d[\text{His}]/dt)_{0,\text{calc}}$ para la reacción de His con $^1\text{O}_2$, se presentan en la Tabla 10.1, donde se pueden observar que las velocidades de consumo calculadas y obtenidas experimentalmente para la reacción fotosensibilizada de His por Ptr. Los resultados indicaron que en medio ácido las velocidades son de orden diferente, por lo tanto, se demuestra que el mecanismo principal de degradación de la His a esta condición de pH no está mediado por el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).

Por otra parte, en las soluciones en medio alcalino, se realizaron dos pruebas con geometría diferente, para hacer una mejor estimación de la velocidad de consumo de His. En ambos experimentos, las velocidades calculadas y experimentales tienen órdenes similares, lo que es una evidencia a favor en la cual el 1O_2 juega un rol significativo en la oxidación de la His.

Tabla 10.1. Velocidades experimentales y calculadas de consumo de His durante la reacción fotosensibilizada de Ptr (100 μ M) de soluciones aireadas en ambas condiciones de pH.

	Solvente	P_0 (Einstein $L^{-1} s^{-1}$)	Experimental ($\mu M s^{-1}$)	Calculado* ($\mu M s^{-1}$)
pH/pD 5.5	H ₂ O	1.40×10^{-5}	-0.2 ± 0.1	-0.0031
	D ₂ O		-0.1 ± 0.1	-0.051
pH/pD 10.5	H ₂ O	1.40×10^{-5}	-0.18 ± 0.01	-0.11
	D ₂ O		-1.6 ± 0.1	-1.13
pH/pD 10.5	H ₂ O	9.8×10^{-6}	-0.038 ± 0.001	-0.082
	D ₂ O		-0.82 ± 0.02	-0.57

*Este valor fue calculado para la reacción de His con 1O_2

10.3.4 Irradiación en presencia de SOD

En la sección anterior se demostró que la contribución del 1O_2 en medio ácido puede ser despreciable y en medio alcalino está presente en alta proporción. En el caso de otros aminoácidos estudiados anteriormente, como lo son Trp (Capítulo 5) y Tyr (Capítulo 8) la degradación a pH ácido es iniciado principalmente por una transferencia de electrones desde el estado fundamental del aminoácido al estado excitado triplete de la Ptr ($^3Ptr^*$). Está bien establecido, que en un proceso típico tipo I, el estado fundamental del O_2 atrapa fácilmente el anión radical orgánico resultante para producir el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)^{7,8}. La detección de H_2O_2 puede entonces ser el producto de la dismutación espontánea del $O_2^{\bullet-}$ en solución acuosa⁹. Por lo tanto, se investigó la participación de $O_2^{\bullet-}$ en los procesos, mediante la realización de experimentos comparativos en presencia y en ausencia de superóxido dismutasa (SOD) (50 U/ mL), la cual es una enzima que cataliza la conversión del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en H_2O_2 y en O_2 ¹⁰.

Los resultados, presentados en la Figura 10.14, mostraron que la velocidad de degradación de la His en ausencia ó presencia de SOD, en ambas condiciones de pH, fueron similares dentro del error experimental, indicando que el $O_2^{\bullet-}$ no contribuye a la

recuperación del sustrato en la reacción en ambas condiciones de pH, caso contrario a lo que se observaba con otros sustratos en donde esta especie era una vía de recuperación.

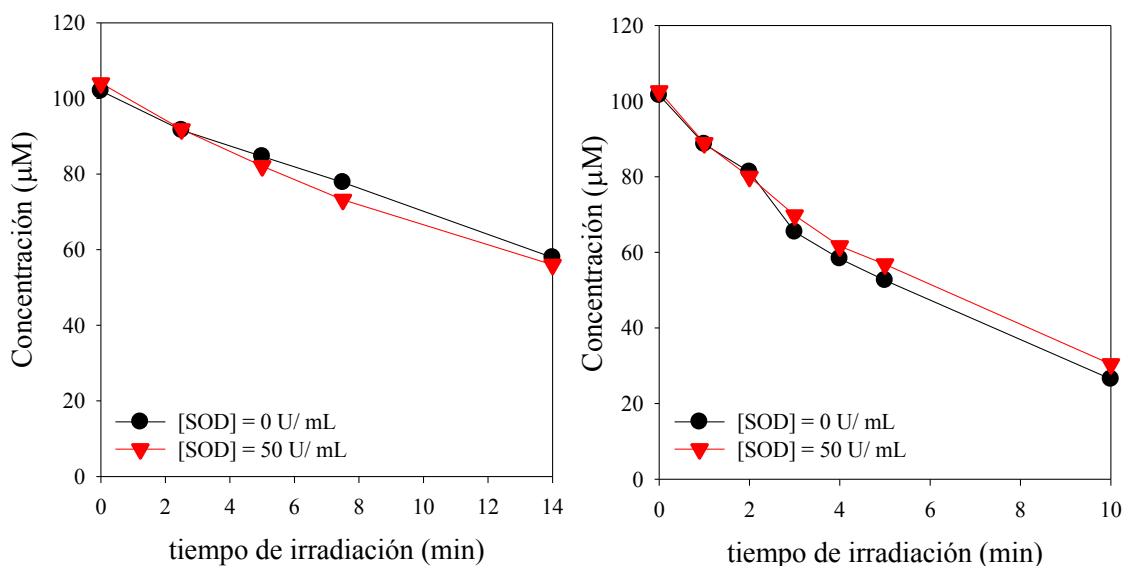
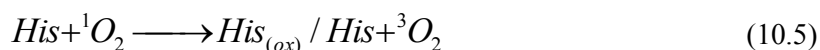
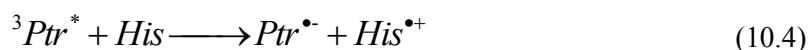
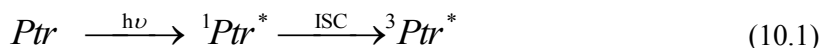


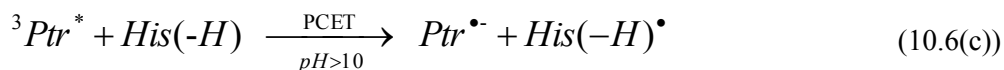
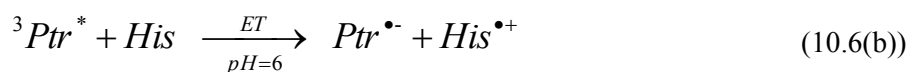
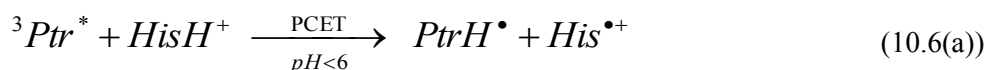
Figura 10.14. Evolución de la concentración de His de soluciones acuosas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación, en presencia y ausencia de SOD; **(a)** pH 5,43; **(b)** pH 10,45; $[Ptr]_0 \sim 100 \mu\text{M}$; $[His]_0 \sim 100 \mu\text{M}$; $[SOD] = 50 \text{ U/mL}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

10.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

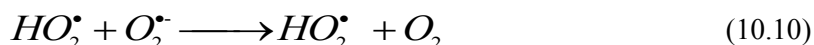
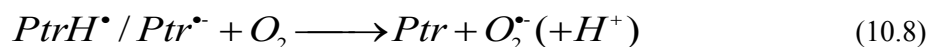
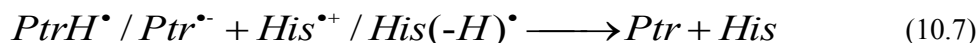
Luego de la formación del estado triplete de la Ptr ($^3Ptr^*$) (Reacción (10.1)), este estado excitado puede desactivarse por tres procesos que pueden ser: (i) desactivación por cruce entre sistemas al estado fundamental (Reacción (10.2)), (ii) transferencia de energía al oxígeno molecular llevando a la regeneración de la Ptr y la formación de 1O_2 (Reacción (10.3)) y (iii) la transferencia de electrones entre el estado fundamental de la His y $^3Ptr^*$ llevando al correspondiente par radical ($His^{\bullet+}$ y $Ptr^{\bullet-}$) (Reacción (10.4), mecanismo tipo I). Cuando el 1O_2 reacciona con la His, esto lleva a la generación de productos (Reacción (10.5), mecanismo tipo II).



Dependiendo de la forma ácido base en que se encuentre la His, el mecanismo de transferencia de electrones podría ser acoplado por una transferencia de protón o no. Por ejemplo, a $\text{pH} < 6$, el grupo imidazole es protonado (Esquema 10.1), por lo que una transferencia de electrón acoplada a protón (PCET) es probablemente el mecanismo principal (Reacción 10.6 (a)). A pH neutral, el grupo imidazol está en su forma neutral, y una transferencia de electrón (ET) es el mecanismo más eficiente (Reacción 10.6 (b)). A $\text{pH} > 10$, ambas moléculas tienen carga negativa, por lo tanto una transferencia de electrón puede ser más eficiente (Reacción 10.6 (c))



En ausencia de O_2 , el radical $\text{PtrH}^\bullet/\text{Ptr}^{\bullet-}$ y $\text{His}^{\bullet+}/\text{His}(-\text{H})^\bullet$, formados en la transferencia de electrones (Reacciones 10.6 (a), (b) y (c)) pueden recombinar eficientemente (Reacción (10.7)). Esta recombinación explica la inhibición en el consumo de His en las soluciones burbujeadas con Ar. En presencia de O_2 , la transferencia de electrones $\text{PtrH}^\bullet/\text{Ptr}^{\bullet-}$ al O_2 regenera la Ptr y lleva a la formación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Reacción (10.8)), el cual dismuta con su respectivo ácido conjugado HO_2^\bullet para formar H_2O_2 (Reacciones (10.9) y (10.10)).



Como ya observamos en los resultados, la dependencia del pH en la reacción es bastante considerable. Es decir, a $\text{pH} \sim 5,5$, mientras la Ptr está en la forma ácida, la His presenta una mezcla entre su forma protonada (HisH^+) y neutral (His). Mientras que a $\text{pH} \sim 10,5$, la Ptr está en su forma básica y la His está en su forma no protonada ($\text{His}(-\text{H})^-$) y es la más relevante de las especies. Solo la His y $\text{His}(-\text{H})^-$, no son reactivas con el $^1\text{O}_2$.

Si se asume que el consumo de His es principalmente por un proceso tipo I, un incremento en la concentración de O_2 (soluciones saturadas con O_2) llevaría a un descenso considerable en la velocidad de consumo, ya que los estados excitados $^3Ptr^*$ reaccionan con la His por transferencia de electrones, como se observa en la Figura 10.12 (a), evidenciando que el mecanismo tipo II no predomina en este medio. Además, la velocidad de consumo en D_2O de las soluciones en medio ácido es similar a las observadas en soluciones en H_2O (dentro del error experimental).

Por el contrario, en las soluciones en medio alcalino, la velocidad de degradación de la His es mucho mayor en D_2O , pero la velocidad de consumo de las soluciones saturadas con O_2 , indica que la degradación de la His en presencia de Ptr es una prueba que un mecanismo tipo II podría predominar.

También se evidenció, que en medio ácido, la generación de H_2O_2 es del mismo orden que el consumo del aminoácido, es decir por cada molécula de His que se consume se genera la misma cantidad de H_2O_2 (Figura 10.5 (a₁)). Por otra parte, en medio alcalino el consumo de His es mucho mayor que la generación de peróxido (Figura 10.5 (b₁)), indicando que en estas condiciones la formación de esta especie reactiva no se da precisamente por la dismutación de $O_2^{\bullet-}$.

10.4 Conclusiones

Con todos los resultados obtenidos y presentados anteriormente, se confirma que existe una degradación de la His fotosensibilizada por Ptr, además que estas reacciones son dependientes del pH. En las soluciones en medio ácidas (pH 5,5), el mecanismo involucran una oxidación iniciada por una transferencia de electrones desde el estado triplete de la Ptr ($^3Ptr^*$) al estado fundamental del aminoácido, llevando a la formación del par radical (Ptr^{\bullet} e $His^{\bullet+}$). Por otra parte, en las soluciones en medio alcalino (pH~10,5) los resultados obtenidos demostraron que existe una mezcla de ambos mecanismos (tipo I y tipo II), los cuales compiten por la degradación de la His. En estas condiciones se identificó la formación al menos dos productos, uno de ellos es generada por la formación de endoperóxidos inestables que conllevan a la generación de un bicyclo intramolecular por el ataque nucleofílico del grupo amino ya oxidado; además se identificó la formación de productos diméricos oxidados. En medio ácido se observó la formación de un producto que por el momento no ha sido identificado.

Bibliografía

1. Pattison, D. I.; Rahmantoa, A. S.; Davis, M. J. ; *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 38–53 (2012).
2. Tsentalovich, Y.P.; Lopez J. J.; Hore, P. J.; Sagdeev, R. Z. . ; *Acta A*; **58**, 2043–2050 (2002).
3. Matheson, I. B. C. and J. L. No Title. *Photochem. Photobiol.* **29**, 879–881 (1978).
4. Panov, M. S.; Saprygina, N. N.; Morozova, O. B.; Kiryutin, A. S.; Grishin, Y. A.; Yurkovskaya, A. V. ; *Appl. Magn. Reson.* **45**, 1019–1033 (2014).
5. Muszkat, K. A.; Wismontski-Knittel, T. ; *Biochemistry*; **24**, 5416–5421 (1985).
6. Denofrio, M. P.; Lorente, C.; Breitenbach, T.; Hatz, S.; Cabrerizo, F. M.; Thomas, A. H.; Ogilby, P. R. . ; *Photochem. Photobiol.* (2011).
7. Hodgson, E. K. and Fridovich, I. . ; *Photochem. Photobiol.* **18**, 451–455 (1973).
8. Eriksen, J.; Foote, C. S. and Parker, T. L. . ; *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 6455–6456 (1977).
9. Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L. and Ross, A. B. . ; *J. Phys. Chem.* **14**, 1041–1100 (1985).
10. Fridovich, I. ; *Photochem. Photobiol.* **28**, 733–741 (1978).

Capítulo 11: Degradación fotosensibilizada de metionina libre en presencia de oxígeno

Teniendo en cuenta lo planteado en la *Sección 5.1.4.*, donde se explicó que la Met puede ser oxidada por procesos fotosensibilizados, se realizó un estudio del mecanismo de oxidación de la Met en presencia de compuestos pterínicos. En particular se centró la investigación en la determinación del mecanismo de reacción que conlleva a la oxidación del aminoácido (mecanismo tipo I y tipo II) y a la generación de fotoproductos. También se investigó el efecto del oxígeno disuelto O_2 en la eficiencia del proceso y la participación del estado triplete del fotosensibilizador.

Los resultados de la reacción fotosensibilizada de Met por Ptr, se presentan en dos capítulos, ya que se ha demostrado que la oxidación de la Met se da tanto en presencia como en ausencia de O_2 . Por lo tanto, en este capítulo se presentan los resultados obtenidos en presencia de O_2 y en el siguiente en ausencia de O_2 .

11.1 Evaluación de la capacidad de compuestos pterínicos para fotosensibilizar Met

Para comenzar el estudio se prepararon soluciones que contenían Ptr y Met, las cuales se expusieron a irradiación estacionaria a 350 nm (Sistema II de irradiación, *Sección 6.3.1*) por diferentes periodos de tiempo a pH 5,5 – 6,0. Considerando el equilibrio ácido – base de la Ptr, se puede confirmar que más del 99% está en su forma ácida en las condiciones de pH trabajado. Por otra parte, en las condiciones de irradiación se puede asegurar que el fotosensibilizador es la única especie excitada, como se puede observar en la Figura 11.1.

Las soluciones irradiadas se analizaron por diferentes técnicas espectroscópicas, tales como espectroscopia *UV-Vis*, HPLC-PDA, espectrometría de masas (*UPLC-MS*), medida electroquímica de oxígeno disuelto y medida de generación de peróxido, (Capítulo 7).

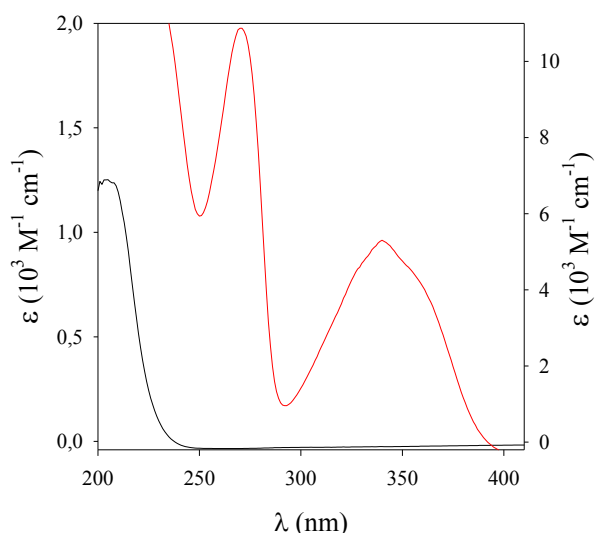


Figura 11.1. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de (-) Ptr y (-) Met. $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[Met]_0 = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5,5$.

11.1.1 Análisis espectroscópico

Para determinar la capacidad de la Ptr de inducir la oxidación de Met en solución acuosa bajo irradiación, se tomaron los espectros de absorción de las soluciones irradiadas por diferentes periodos de tiempo (Figura 11.2) Los resultados observados indicaron que se producen cambios espectrales, lo que quiere decir que existe un cambio en la composición de la solución. Además se observaron cambios espectrales a la longitud de onda donde absorbe el fotosensibilizador, lo que indicaría que existe alguna reacción que hace que este compuesto se consuma.

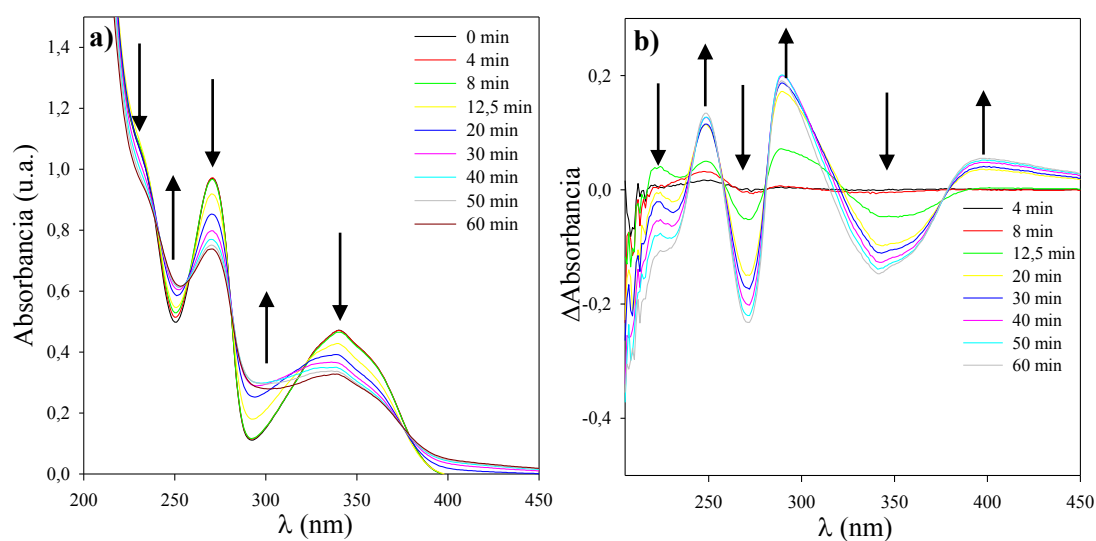


Figura 11.2. (a) Espectros de absorción de soluciones de Ptr y Met irradiadas durante diferentes periodos de tiempo; (b) Espectros diferencia; $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[Met]_0 = 1 \text{ mM}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\text{pH} 5,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

11.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Las soluciones que contenían Met y Ptr fueron irradiadas y analizadas por HPLC-PDA utilizando la Fase móvil II y la columna Synergi Polar RP (Sección 7.1.2). En el caso del aminoácido la λ_{ana} fue 220 nm y para el fotosensibilizador 340 nm. Es importante aclarar que las condiciones de concentración de la Met en este caso fueron mayores, con el objetivo de tener una mejor detección por el HPLC, ya que el coeficiente de absorción molar de este compuesto es bajo (Capítulo 6).

Los cromatogramas de las muestras sin irradiar, mostraron una buena separación para la Met y Ptr, con t_r 4,29 y 23,61 min respectivamente. En la Figura 11.3 se presentan los cromatogramas registrados para el tiempo de irradiación 0 min, 15 min y 30 min, en donde se puede observar, además del consumo de Met, el descenso en la concentración de Ptr en función del tiempo de irradiación (Figura 11.3). Por otra parte, se genera un pico de baja intensidad con $t_r = 15,8$ min, el cual posee un espectro similar al de un dihidroderivado (Figura 11.3, Inset).

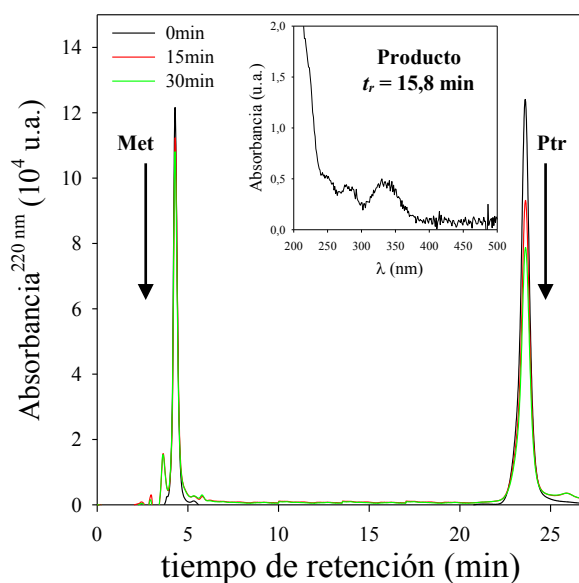


Figura 11.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y Met equilibradas con aire; $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[Met]_0 = 670 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}} = 220 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

Los procesos fotosensibilizados de aminoácidos, tales como triptófano y tirosina en presencia de Ptr, conllevan a la recombinación del radical anión del fotosensibilizador y el radical catión del sustrato. Como consecuencia de esto, no se observaba un descenso en el consumo de la Ptr en función del tiempo de irradiación. En este caso se observó además del descenso del fotosensibilizador, la aparición de un producto similar al

dihidroderivado, lo que podría sugerir que la Ptr está sufriendo una fotoreducción. Es importante aclarar, que la dihidropterina es un compuesto inestable y por lo tanto puede justificarse su baja intensidad en estos experimentos, además, este dihidroderivado no es un compuesto comercial. Para comprobar esto se realizaron pruebas con 6-metilpterina (Mep), el cual es un compuesto pterínico cuyo dihidroderivado, 6 metil-7,8 dihidropterina (H_2Mep), es fácilmente detectable y cuantificable por métodos cromatográficos, ya que se ambos compuestos se separan¹, además H_2Mep es más estable que la dihidropterina². Por otra parte, se cuenta con el patrón de H_2Mep para su identificación.

Los cambios espectrales se realizaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente para los experimentos con Ptr, donde se observó el mismo comportamiento presentado anteriormente (Figura 11.2), es decir, el espectro de absorción de las soluciones que contenían Mep y Met cambiaron en función del tiempo de irradiación y la longitud de onda donde absorbe el fotosensibilizador (340 nm) disminuyó, indicando que se genera algún cambio químico sobre el mismo.

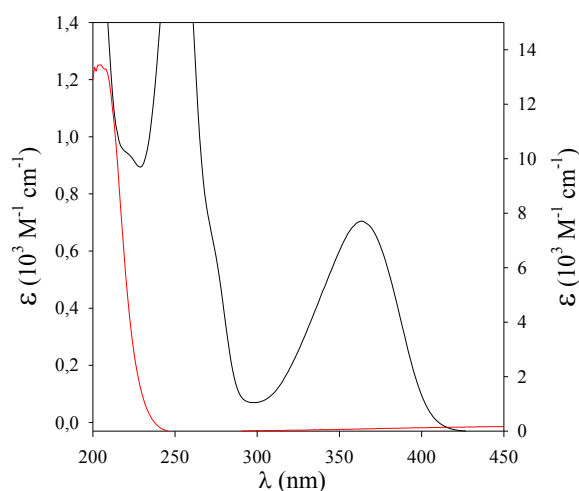


Figura 11.4. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas a (-) Mep y (-) Met. $[Mep]_0 = 120\mu M$; $[Met]_0 = 610\mu M$, pH = 5,5.

El análisis cromatográfico, de las soluciones de Mep y Met a pH 5,5 mostró una buena separación del sustrato y el fotosensibilizador, con t_r 4,3 min y 23,6 min, respectivamente (Figura 11.5). Los cromatogramas de las soluciones irradiadas, indicaron que los picos de la Mep y Met disminuían en función del tiempo de irradiación (Figura 11.5). Por otra parte, se generan al menos dos picos los cuales crecen en función del tiempo de irradiación, con $t_r = 3,6$ min y 16,1 min, denominados P_1 y P_2 . Este último posee un espectro de absorción similar al de H_2Mep (Figura 11.5, Inset).

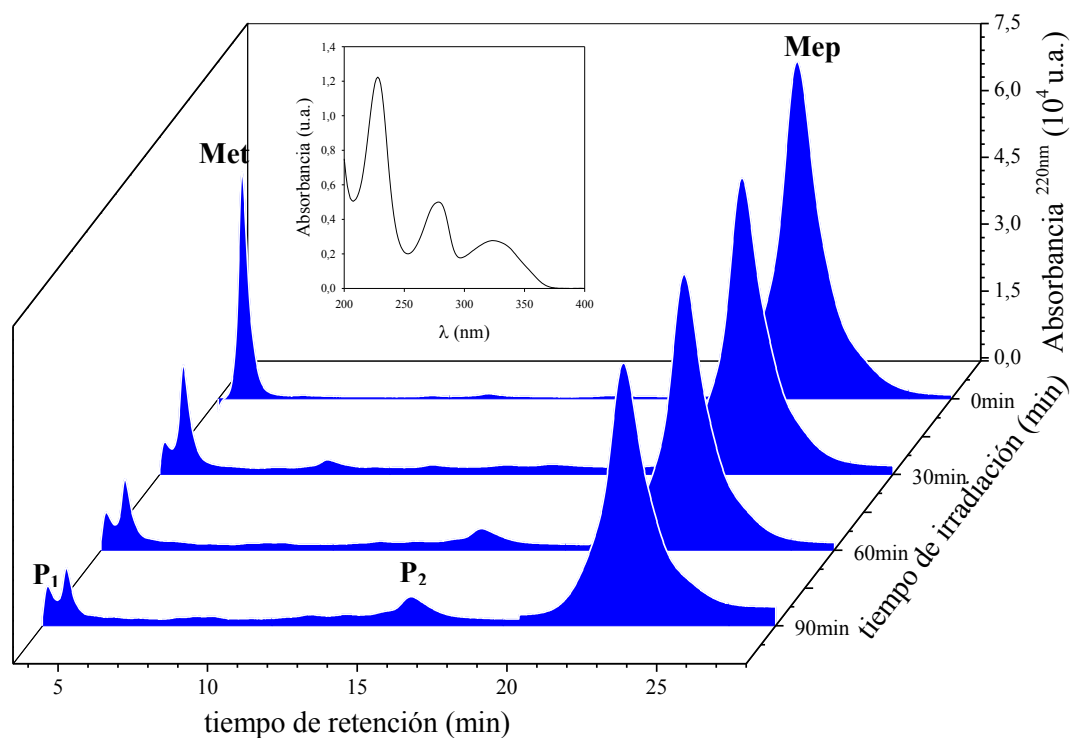


Figura 11.5. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Mep y Met equilibrada con aire. Inset: Espectro de absorción de P₂. [Mep]₀ = 120 μ M; [Met]₀ = 610 μ M; λ_{irr} = 350 nm; λ_{ana} = 220 nm; pH = 5,5; l = 1 cm.

El perfil de concentración, obtenido de la integración de cada uno de los picos (Met y Mep), en sus respectivos máximos de absorción, mostró un consumo apreciable del aminoácido y de la Mep (Figura 11.6), además de la formación de P₁ y P₂.

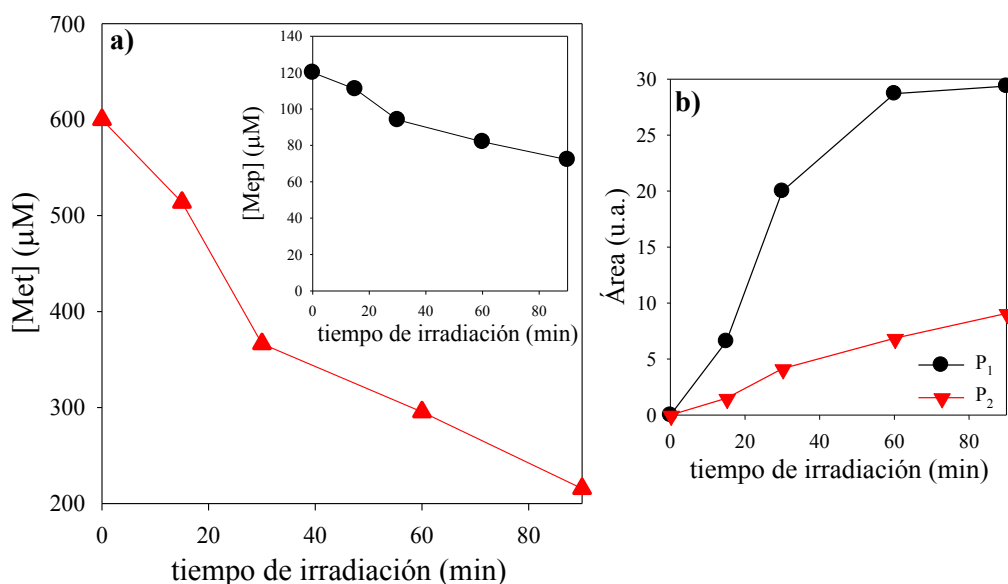


Figura 11.6. (a) Evolución de la concentración de Met y Mep en solución acuosa aireada en función del tiempo de irradiación; **(b)** Formación de P₁ y P₂; [Mep]₀ = 120 μ M; [Met]₀ = 610 μ M; λ_{irr} = 350 nm; λ_{ana} (Met) = 220 nm; λ_{ana} (Mep) = 340 nm; pH = 5,5; l = 1 cm.

Previamente se ha demostrado que bajo condiciones anaeróbicas, diferentes sustratos con bajo potencial de ionización, tales como EDTA^{3,4}, inducen la fotoreducción de pterinas. Por lo tanto, en las condiciones que se está realizando estos experimento, se podría suponer que existe un decaimiento drástico de la concentración de O_2 en la solución en función del tiempo de irradiación, lo cual lleve a condiciones anaeróbicas y por lo tanto esto podría ser la causa en la disminución de la concentración de Mep y además la posible generación de H_2Mep .

Para comprobar esto, se realizaron experimentos en los cuales se burbujea periódicamente aire (Aire/Burb) a la solución, con el fin de mantener el equilibrio de la concentración de O_2 durante la reacción. Los resultados indicaron que la Met disminuye su concentración durante el tiempo de irradiación, y en estas condiciones la Mep permanece constante (Figura 11.7).

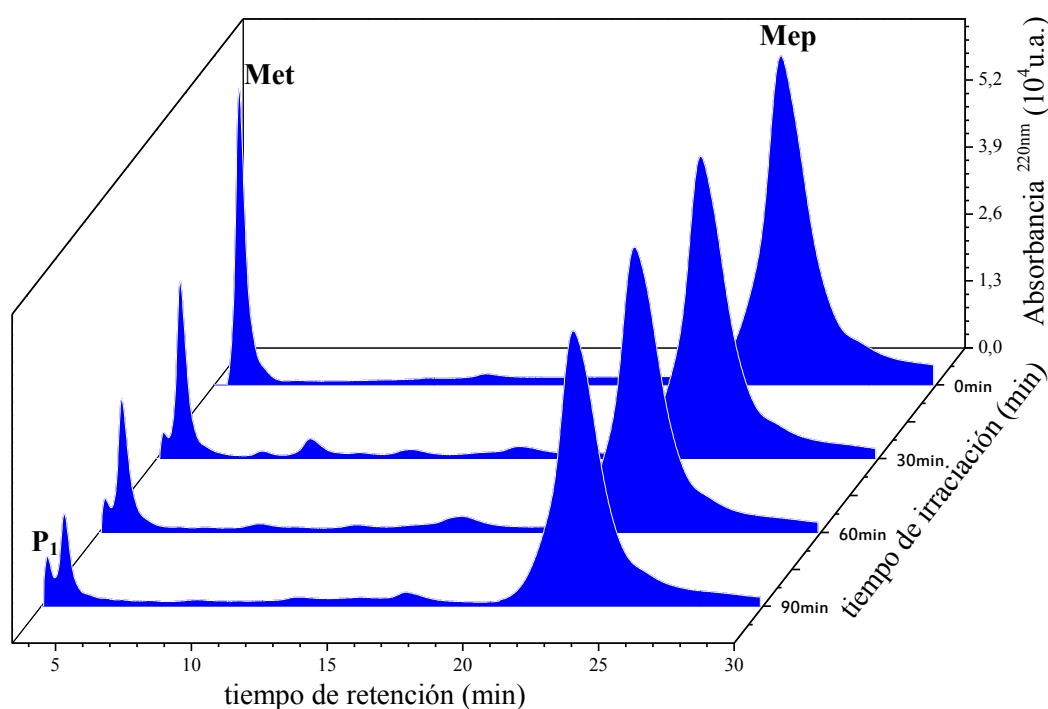


Figura 11.7. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Mep y Met equilibradas con aire; burbujeada periódicamente (Aire/Burb). $[Mep]_0 = 110 \mu M$; $[Met]_0 = 510 \mu M$; $pH = 5,5$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{ana} = 220 \text{ nm}$.

Integrando cada uno de los picos en las condiciones Aire/Burb se obtuvieron los perfiles de concentración de la Mep y Met en función del tiempo de irradiación, los cuales mostraron un consumo del fotosensibilizador despreciable (Figura 11.8 (a)) en comparación con los experimentos anteriores. Además se observó la generación de H_2O_2 en función del tiempo de irradiación. Por otra parte, se observó la generación de P_1 , y no se formó P_2 en estas condiciones (Figura 11.8 (b)). Todo esto indica que la

fotoreducción no tiene lugar cuando se trabaja en las condiciones de Aire/Burb, ya que se trabaja con concentración de O_2 constante en el tiempo que dura la irradiación.

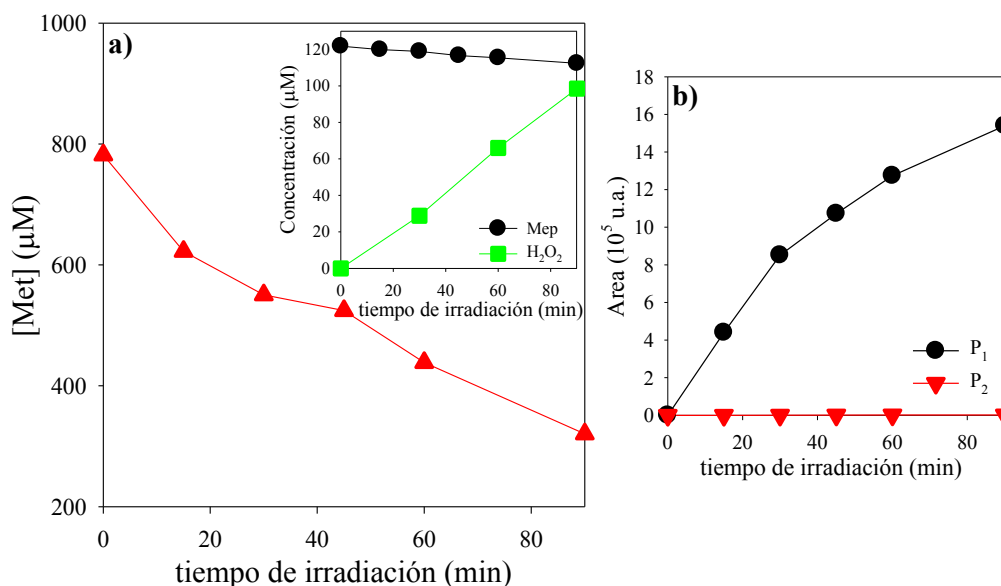


Figura 11.8. (a) Evolución de la concentración de Met y Mep en solución acuosa Aire/Burb en función del tiempo de irradiación. **(b)** Formación de P_1 y P_2 ; $[\text{Mep}]_0 = 110 \mu\text{M}$; $[\text{Met}]_0 = 510 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Met}) = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Mep}) = 340 \text{ nm}$; $\text{pH} = 5,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

Para confirmar lo planteado, se hicieron pruebas en ausencia de O_2 con el fin de observar el comportamiento de las soluciones que contenían Mep y Met a pH 5,5. En este caso se realizaron experimentos burbujando las soluciones con Ar antes de cada irradiación. Los resultados, presentados en la Figura 11.9 (a), demostraron que, además del consumo de Met, la Mep sufre una disminución en la concentración y se observó la formación de P_2 con $t_r = 16,5 \text{ min}$, el cual aumenta en función del tiempo de irradiación. El espectro de absorción, como se había mencionado anteriormente, coincide con el de la $H_2\text{Mep}$ (Figura 11.9 (b)).

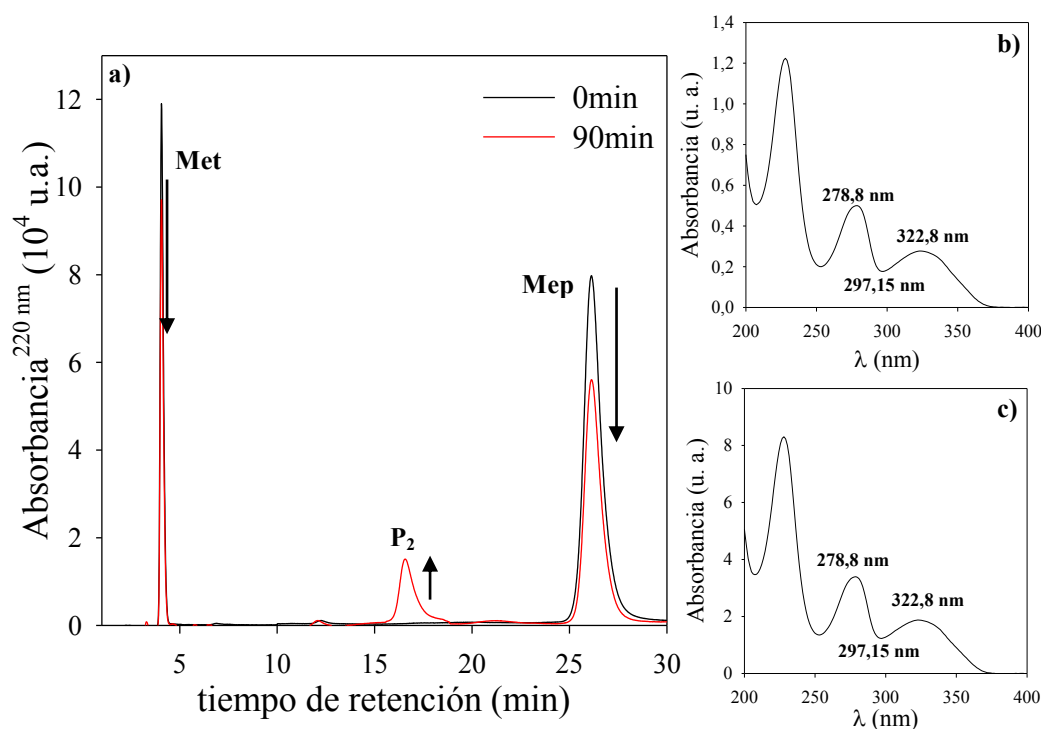


Figura 11.9. (a) Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución anaeróbica (Ar) de Mep y Met; (b) Espectro de absorción del producto formado en $t_r = 16,5$ min; (c) Espectro de absorción del patrón puro de H_2Mep ; $[Mep]_0 = 110 \mu M$; $[Met]_0 = 620 \mu M$; $\lambda_{irr} = 350$ nm; $\lambda_{ana} = 220$ nm; pH = 5,5.

Teniendo en cuenta los resultados presentados hasta ahora, se puede plantear la existencia de dos procesos paralelos, uno de ellos depende de la presencia de O_2 y sería el responsable del consumo del sustrato en aire y el cual ocurriría sin consumo de Mep. El segundo proceso no necesita O_2 para que ocurra, en el cual se produce un consumo menor de Met, pero también se consume el fotosensibilizador. Este comportamiento es particular y no se había observado anteriormente con otros sustratos. Debido a esto, las reacciones que se realizaron en ausencia de O_2 se presentan en el Capítulo 12. En las secciones siguientes de este capítulo se muestran los resultados en presencia de O_2 (Aire/Burb) con el objetivo de dilucidar el mecanismo de reacción para la fotosensibilización de Met inducido por Mep en condiciones aeróbicas.

11.1.3 Medida electroquímica de la concentración de O_2

Para identificar si el oxígeno disuelto está interviniendo en la reacción, se hicieron experimentos en estado estacionario midiendo la concentración de oxígeno con el equipo descrito en la Sección 7.1.6.

En principio se realizaron los controles en ausencia de Met, dando como resultado un consumo despreciable de O_2 en todo el tiempo que se realizó la irradiación (Figura 11.10). Por otra parte, cuando se irradiaron las soluciones de Mep y Met, se observó un descenso en la concentración de O_2 lo que sugiere que la reacción está mediada por la presencia de esta especie y que es fundamental para que suceda (Figura 11.10).

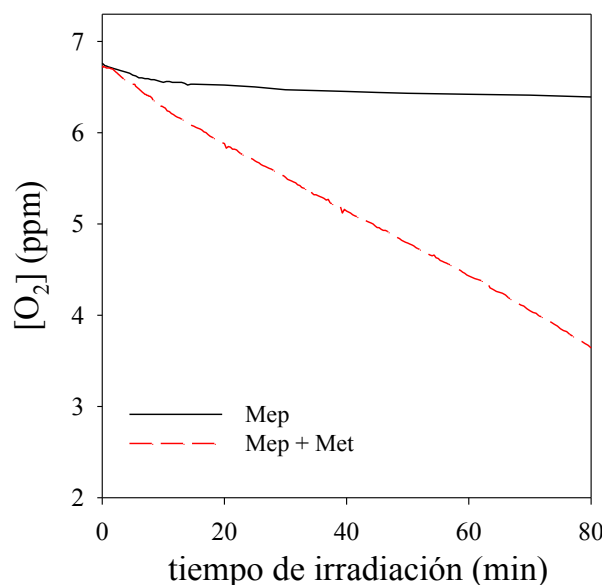


Figura 11.10. Evolución de la concentración de O_2 en soluciones irradiadas de Mep en ausencia y presencia de Met en función del tiempo. $[Mep]_0 = 100 \mu M$; $[Met]_0 = 600 \mu M$; pH = 5,6.

11.1.4 Controles

Se realizaron mezclas que contenían Mep y Met en condiciones similares a las utilizadas en los experimentos de fotosensibilización y se dejó en la oscuridad aproximadamente por 3 horas a temperatura ambiente, para luego tomar los espectros de absorción. Posteriormente fueron cuantificadas por HPLC-PDA, para determinar la concentración de los reactivos y descartar una posible reacción térmica. Dentro del tiempo que duró el experimento, no se observaron modificaciones de la concentración de ninguno de los reactivos, con lo que se puede descartar cualquier tipo de reacción térmica. El otro control consistió en registrar los espectros de absorción de las soluciones irradiadas de Met a 350 nm equilibradas con aire en ausencia de Mep. Los resultados demostraron que no existen cambios significativos en los espectros durante las 3 horas de irradiación, indicando que no existen cambios químicos por irradiación directa del aminoácido. Este resultado es lógico ya que el aminoácido no absorbe radiación a longitudes de onda mayores a 250 nm (Figura 11.4). Pero al trabajar a

condiciones de concentración mayor era necesario descartar cualquier efecto debido a la absorción directa de radiación. Además debido a que el tiempo de irradiación era mayor a los utilizados en otros sistemas, era importante descartar cualquier efecto de calor disipado por las condiciones de medida.

11.2 Análisis de fotoproductos

11.2.1 Cromatografía líquida (HPLC)

Los análisis de HPLC-PDA, muestran la generación de al menos un producto P_1 . Se ha reportado que en la oxidación de Met, uno de los productos generados es el sulfóxido de metionina (MetSO), el cual corresponde a la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula de Met. Teniendo en cuenta que el espectro de absorción de P_1 tiene similitudes con el espectro del patrón de MetSO (Figura 11.11 (a) y (b)), se decidió investigar la formación de este producto en la reacción fotosensibilizada de Mep y Met. En la Figura 11.11, se presenta un segmento del cromatograma de una muestra irradiada por 90 min, en donde se observa la formación de P_1 con t_r 3,6 min. Utilizando como patrón interno el MetSO, se registraron los cromatogramas de las soluciones irradiadas en presencia y en ausencia del patrón. Luego se compararon los t_r de ambas soluciones donde se observó un aumento del pico en el mismo t_r de P_1 al adicionarse el patrón. Estos resultados constituyen una evidencia inicial que la oxidación de Met fotosensibilizada por Mep conlleva a la formación de MetSO.

Por otra parte, en el tiempo de irradiación mayor se observa otro producto, además de P_1 , el cual tiene muy baja intensidad y un t_r ligeramente mayor a P_1 , que se denominará P_3 .

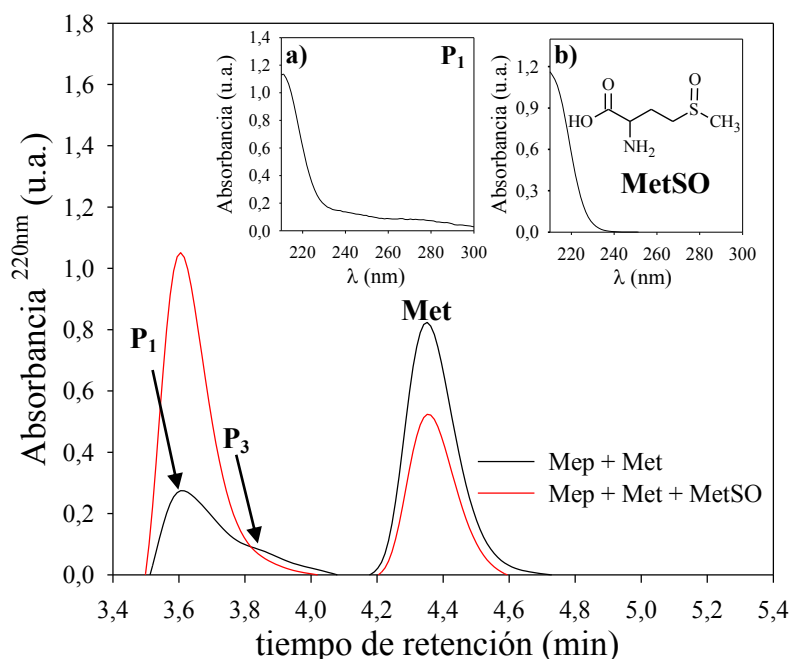


Figura 11.11. Cromatogramas obtenidos por análisis de HPLC-PDA de soluciones irradiadas en presencia y ausencia del patrón MetSO. **(a)** Espectro de absorción de P₁. **(b)** Espectro de absorción MetSO puro. [Mep]₀=100 μM, [Met]₀=600 μM, pH= 5,5; l = 1 cm.

11.2.2 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

Con el objetivo de identificar los productos formados en la reacción, se realizaron experimentos con un equipo UPLC-MS acoplado a espectrometría de masas (*Sección 7.1.3*) de las soluciones aireadas que previamente fueron irradiadas en presencia de Mep y Met. Los experimentos se llevaron a cabo en modo positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻), sin embargo las señales con las cuales se observaron mejores resultados fueron en modo ESI⁺.

La fórmula molecular de la Met es C₅H₁₁NO₂S y su peso molecular es 149.0587 Da. Se tomaron los cromatogramas UV de las muestras de Mep y Met equilibradas con aire a pH 5,5 sin irradiar y luego de 60 min de irradiación, utilizando el detector de absorbancia acoplado al UPLC-MS y fijo en 220 nm como λ_{ana} . El primer cromatograma corresponde a la muestra sin irradiar (Figura 11.12 (a)), en la cual se pueden ver dos pico con t_r de 1,95 min y 6,31 min que corresponde a la Met y Mep respectivamente. Es importante aclarar que los t_r difieren de aquellos obtenidos en los cromatogramas medidos por HPLC-PDA, lo cual es lógico dado que, el equipo, la columna y el flujo de la medida fueron diferentes. Los cromatogramas de las soluciones Aire/Burb, de Mep y Met, después de 60 min de irradiación se presentan en la Figura

11.12 (b), donde se observó la aparición de un pico, el cual eluye con t_r menor a la Met ($t_r = 1,42$ min), denominado P_1' .

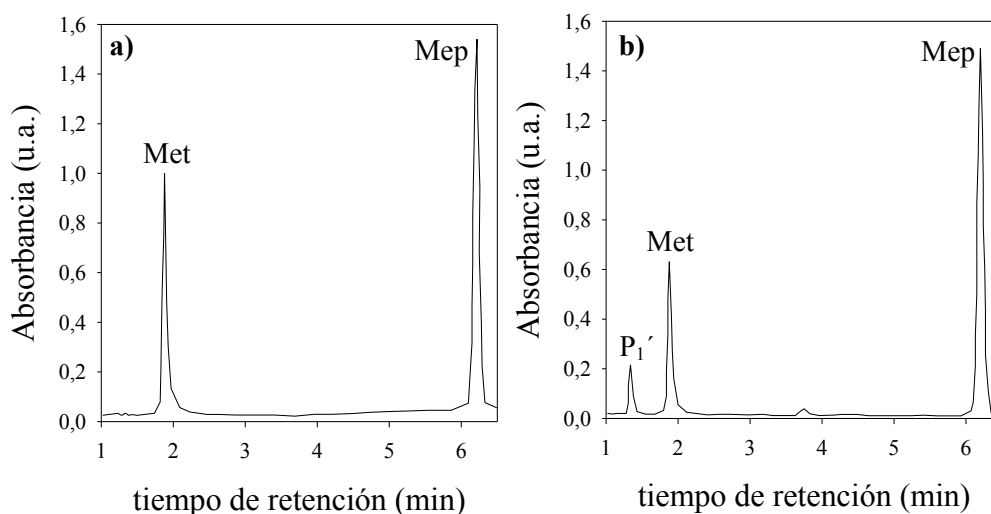


Figura 11.12. Cromatogramas UV registrados de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire. (a) 0 min; (b) 60 min. $[Mep]_0 = 100 \mu M$; $[Met]_0 = 600 \mu M$; $\lambda_{ana} = 220$ nm; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

En la Figura 11.13 se muestran los espectros de masas de los reactivos iniciales, Met y Mep, donde se detectó el ion molecular intacto de la Met ($[M + H]^+ = [Met + H]^+$) a m/z 150,05 Da y el ion molecular de la Mep ($[M+H]^+ = [Mep+H]^+$) a m/z 178,07Da.

Además, se obtuvieron los perfiles de concentración de cada compuesto, integrando los respectivos picos en cada cromatograma (Figura 11.13 (a₁)-(b₁)), para luego graficar el área bajo la curva en función del tiempo de irradiación. Como se puede observar en la Figura 11.13, en el caso de la Met hay una disminución considerable, mientras la Mep permanece constante durante el tiempo que dura el experimento.

Como se mencionó anteriormente, uno de los productos de oxidación de la Met, es MetSO, la cual tiene como fórmula molecular $C_5H_{11}NO_3S$ con un peso molecular 165,0549 Da. El espectro de masas ESI⁺ del pico que corresponde al producto P_1' ($t_r = 1,42$ min) se presenta en la Figura 11.14. En donde se detectó el ion molecular $[Met + O + H]^+$ a m/z 166,0538 Da, correspondiente a la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula de Met, y además se observó el ión molecular más Na^+ $[M + Na]^+ = [Met + O + Na]^+$ a $m/z = 188,0361$ Da. Por otra parte, la integración del pico correspondiente a $m/z = 166,0538$ Da mostró que un aumento en función del tiempo de irradiación (Figura 11.14 (b)).

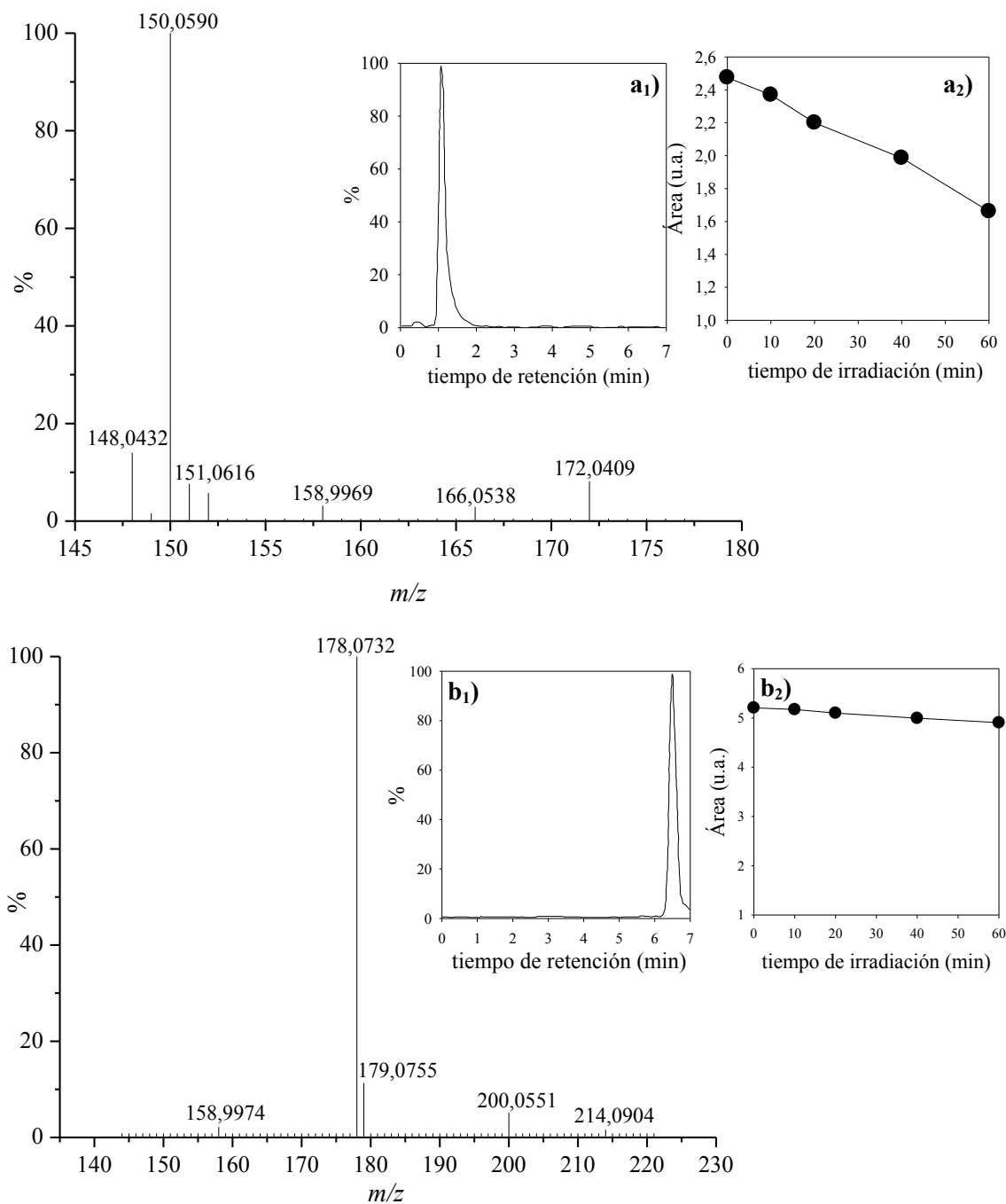


Figura 11.13. Espectros de masas registrados de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire **(a)** Met; **(b)** Mep. [Mep]₀ = 100 μ M; [Met]₀ = 600 μ M; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

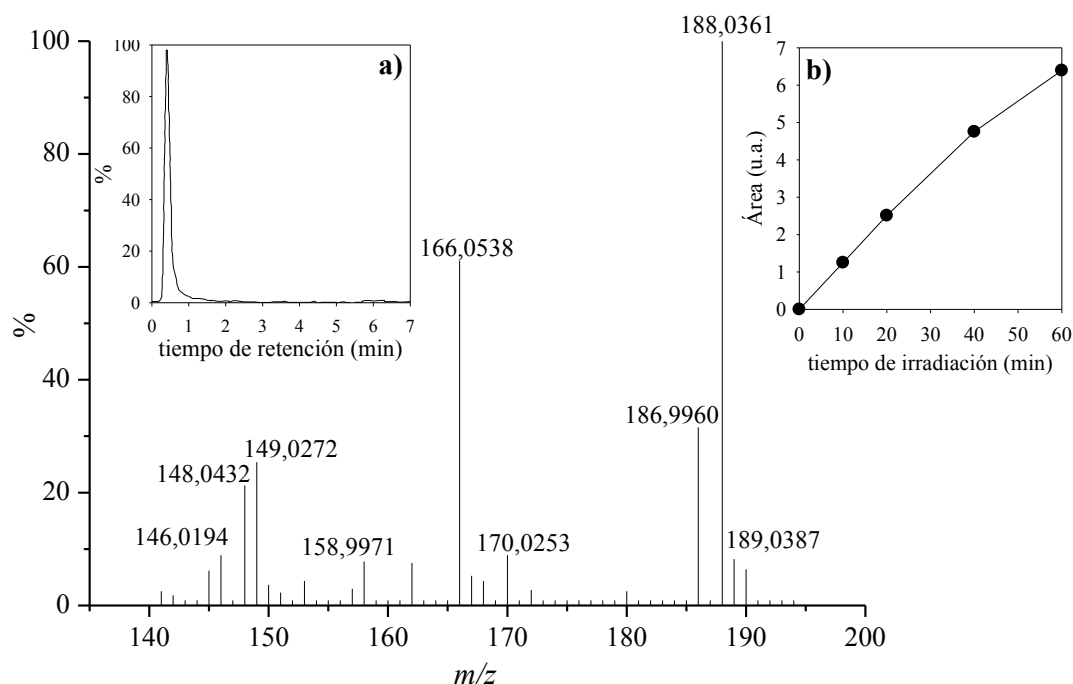


Figura 11.14. Espectro de masas de P_1 de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep equilibradas con aire. **(a)** Cromatograma de masas a $m/z = 166,05$ Da. **(b)** Evolución del producto en función del tiempo de irradiación. $[Mep]_0 = 100 \mu M$; $[Met]_0 = 600 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

La metionina sulfóna ($MetSO_2$), es otro compuesto que previamente ha sido reportado como producto de oxidación de la Met^{5,6}. Tiene como fórmula molecular $C_5H_{11}NO_4S$ con un peso molecular 181,0584 Da. En este caso se identificó el ion molecular $[Met + 2O + H]^+$ a m/z 182,0309 Da (Figura 11.15), el cual corresponde a la incorporación de dos átomos de oxígeno a la molécula de Met, debido a la reacción fotosensibilizada. Este producto tiene baja intensidad y además solo se observó en los tiempos de irradiación mayores.

Con estos resultados se confirmó que las soluciones aireadas de Mep y Met a pH 5,5 irradiadas con luz UV-A, conllevan a la oxidación del aminoácido y a la generación de productos oxigenados, mientras la concentración del fotosensibilizador permanece constante.

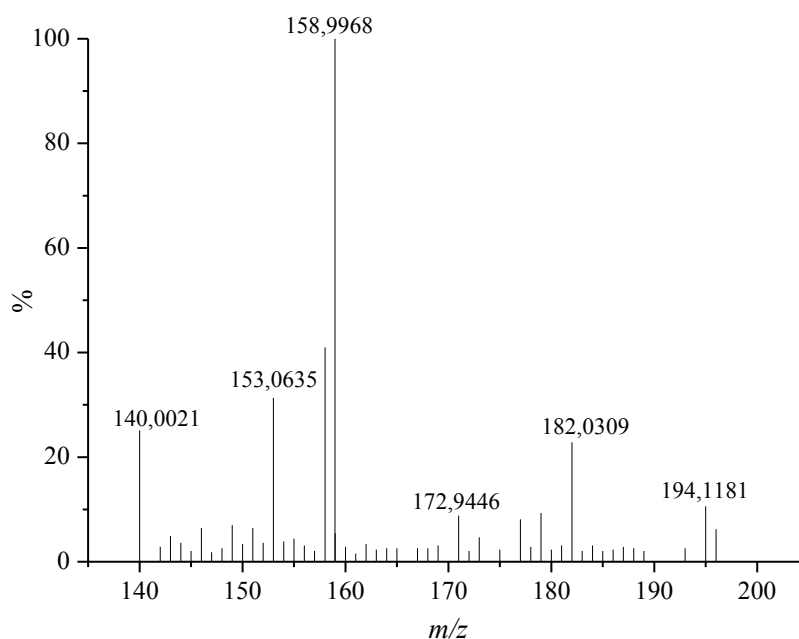


Figura 11.15. Espectro de masas extraídos del cromatograma con t_r 1,61 min de soluciones de Met y Mep equilibradas con aire irradiadas durante 60 min; $[Mep]_0 = 100 \mu M$; $[Met]_0 = 600 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

11.3 Determinación del mecanismo de reacción

11.3.1 Rol del Oxígeno

Para evaluar la participación del O_2 en la reacción fotosensibilizada por las soluciones que contenían Mep y Met, se realizaron burbujeos con O_2 previo a la irradiación, asegurando así una condición de saturación de O_2 . Se cuantificó el consumo de sustrato en estas condiciones y se comparó con respecto a las soluciones en idénticas condiciones pero equilibradas con aire.

En la Figura 11.16 se presenta los perfiles de concentración de Met y Mep en condiciones Aire/Burb y saturación de O_2 , en los cuales se observó que la velocidad de consumo de Met disminuye cuando la concentración de O_2 aumenta, esto puede deberse a la competencia que hay por la desactivación del estado triplete de Mep ($^3Mep^*$) y el O_2 . De esta forma decrece la eficiencia relativa de transferencia de electrones entre el donador de electrones (Met) y el $^3Mep^*$. Por otra parte se observó que el consumo de Mep es despreciable en ambos casos.

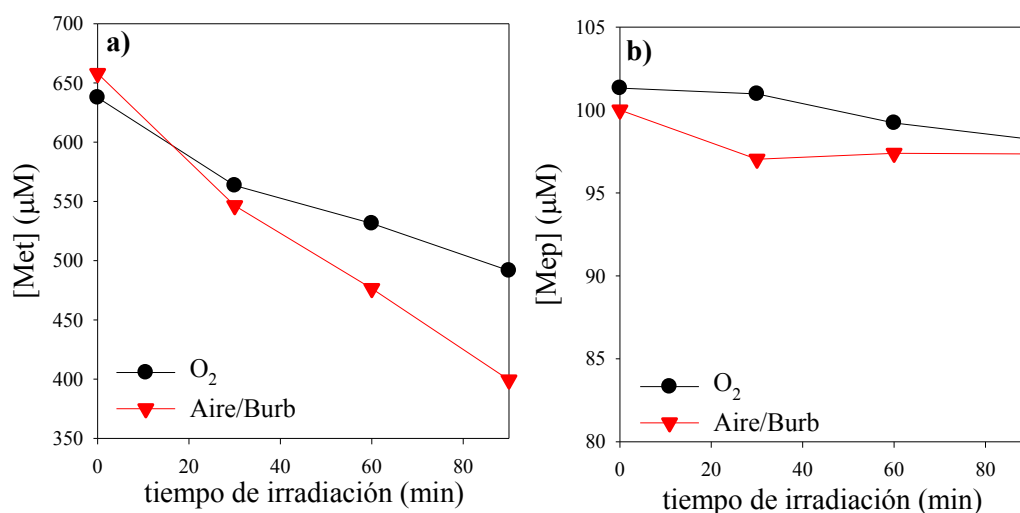


Figura 11.16. Evolución de la concentración de Mep y Met en condiciones Aire/Burb y burbujeadas con O_2 en función del tiempo de irradiación. $[\text{Mep}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{Met}]_0 = 600 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Met}) = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Mep}) = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\text{pH} = 5,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

11.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Se evaluó el estado excitado desde el cual se inicia el proceso fotosensibilizado que se lleva a cabo en presencia de O_2 , realizando experimentos en presencia de KI. Como se reportó anteriormente (Capítulo 6) el Γ a una concentración determinada ($>500 \mu\text{M}$) apaga los estados tripletes de $^3\text{Mep}^*$, sin afectar los estados singletes.

Se realizaron experimentos comparativos irradiando soluciones que contenían Mep y Met en presencia y ausencia de KI a una concentración de $400 \mu\text{M}$. Los resultados de las soluciones aireadas mostraron que existía un efecto inhibitorio en la velocidad de consumo de Met debido a la presencia de KI (Figura 11.17(a)), mientras que la Mep permanecía constante. Esto indica que la reacción entre el aminoácido y el sensibilizador es iniciada desde el estado excitado triplete. Este comportamiento también se observó en la formación de los productos (Figura 11.17 (b)).

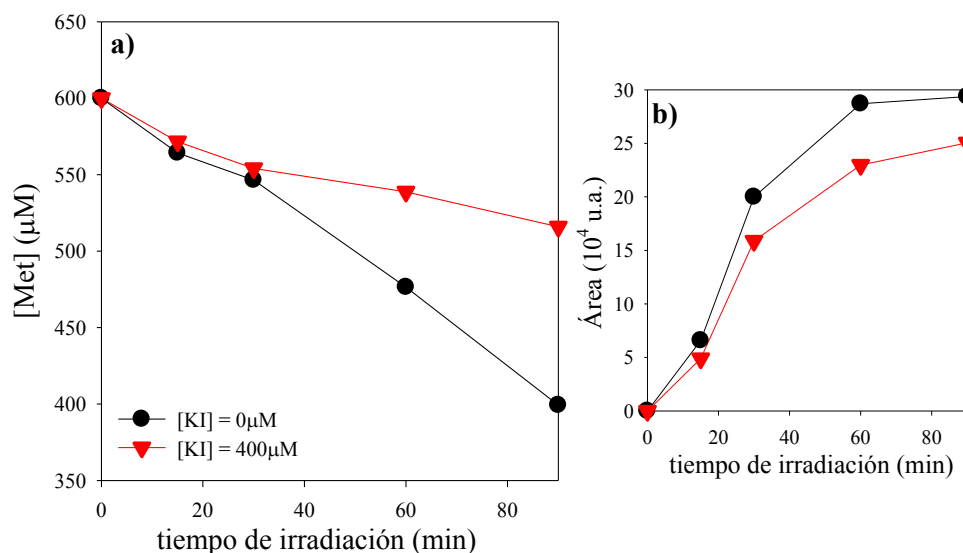


Figura 11.17. (a) Evolución de las concentración de Met de soluciones acuosas en condiciones de Aire/Burb en presencia y en ausencia de KI; **(b)** Formación de P_1 ; $[\text{Met}]_0 = 716 \mu\text{M}$; $[\text{Mep}]_0 = 110 \mu\text{M}$; $[\text{KI}] = 400 \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

11.3.3 Contribución de la oxidación por $^1\text{O}_2$

Se realizaron fotólisis de soluciones aireadas de Mep y Met en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, en donde se siguió el consumo del sustrato por HPLC-PDA y se compara la velocidad de consumo de Met. Como se puede observar en la Figura 11.18, la velocidad de consumo de Met es levemente mayor en agua deuterada, pero no lo suficiente como para afirmar que el $^1\text{O}_2$ es una especie predominante en la oxidación de la Met.

Aunque la velocidad de consumo de Met aumento levemente al cambiar el solvente de H_2O a D_2O (Figura 11.18), el efecto observado es menor al esperado si la reacción ocurriera únicamente por un mecanismo de fotooxidación tipo II. Estos resultados sugieren que la reacción entre Met y $^1\text{O}_2$, no es la vía que predomina en la oxidación fotosensibilizada por Mep.

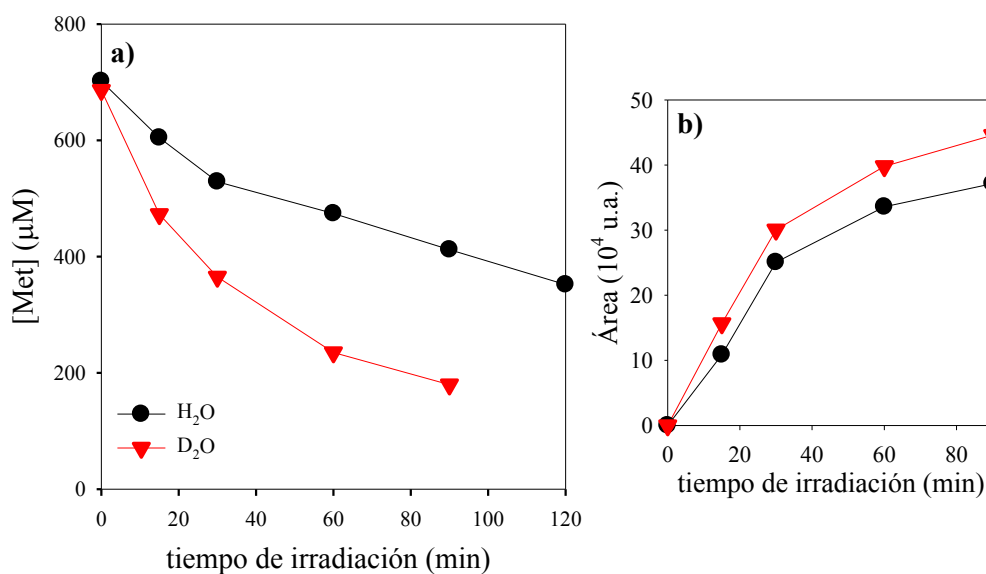


Figura 11.18. (a) Evolución de la concentración de Met en función del tiempo de irradiación de soluciones en D_2O y H_2O ; **(b)** Formación de P_1 ; $[\text{Met}]_0 = 410 \mu\text{M}$; $[\text{Mep}]_0 = 120 \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$;

11.3.4 Irradiación en presencia de SOD

Se evaluó la participación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en el proceso fotosensibilizado de Met inducido por Mep, siguiendo el procedimiento descrito en capítulos anteriores (Capítulo 7). Los resultados se muestran que el consumo de Met se acelera en presencia de SOD (Figura 11.19), lo que puede ser una evidencia que el mecanismo tipo I está presente en la reacción, en el cual el $\text{O}_2^{\bullet-}$ no reacciona apreciablemente con Met, esto se puede explicar con mayor claridad, porque al eliminar el $\text{O}_2^{\bullet-}$ del medio se está suprimiendo una vía de recuperación con el radical catión ($\text{Met}^{\bullet+}$).

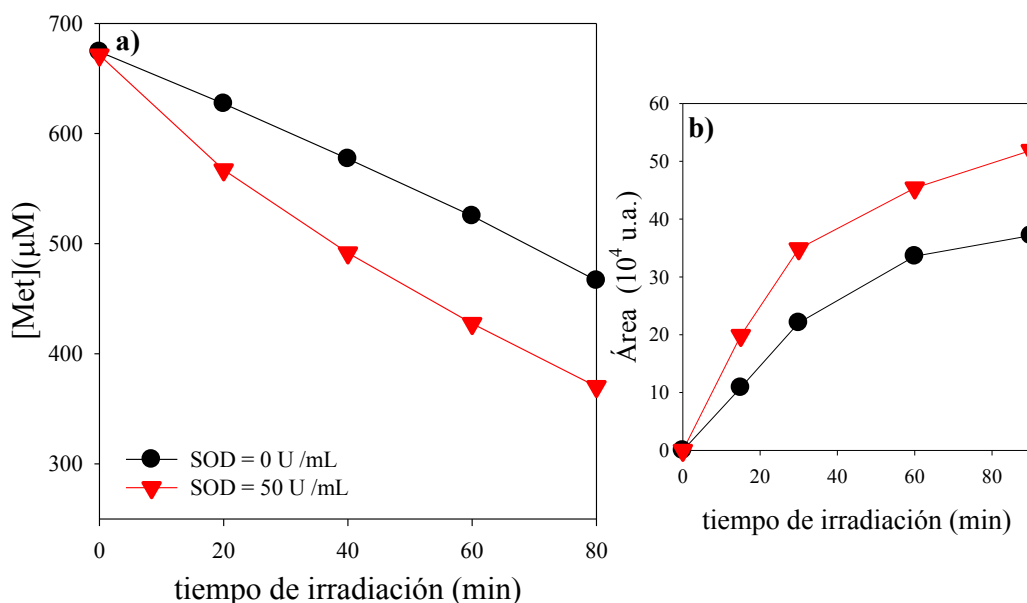
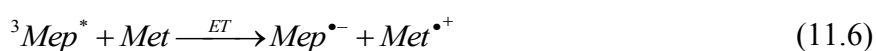
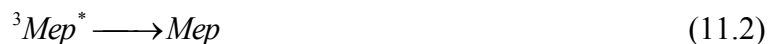
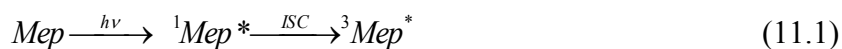


Figura 11.19. (a) Evolución de la concentración de Met en función del tiempo de irradiación de soluciones en presencia y ausencia de SOD; (b) Formación de P_1 ; $[\text{Met}]_0 = 670 \mu\text{M}$; $[\text{Mep}]_0 = 110 \mu\text{M}$; $[\text{SOD}] = 50 \text{ U/mL}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

11.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se realiza la siguiente propuesta de mecanismo, donde se inicia con la absorción de fotones por parte del fotosensibilizador y posteriormente la formación del estado triplete (Reacción (11.1) este estado puede desactivarse por diferentes vías (radiativas y no radiativas). En principio la Mep puede volver a su estado fundamental por cruce entre sistemas (Reacción (11.2)); Por otra parte, puede haber una transferencia de energía de la Mep al O_2 en estado fundamental, esta reacción puede llevar a la formación de $^1\text{O}_2$ (Reacción (11.3)), generada esta especie reactiva del oxígeno puede llevar a la oxidación de la Met (Reacción (11.4)). Y la última reacción que puede suceder para la desactivación de la Mep es la transferencia de electrones entre el estado triplete de la Mep ($^3\text{Mep}^*$) y el estado fundamental de la Met, generando así el respectivo radical anión Mep ($\text{Mep}^{\bullet-}$) y radical catión de la Met ($\text{Met}^{\bullet+}$). En condiciones aeróbicas el radical Mep ($\text{Mep}^{\bullet-}$) es atrapado por el O_2 (Reacción (11.7)), llevando así a la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, y consecuentemente por su dismutación, lleva a la formación de H_2O_2 (Reacción (11.8)). Por otra parte, también el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) puede recombinar con el radical Met ($\text{Met}^{\bullet+}$) para volver a su

estado fundamental (Reacción (11.9)). Finalmente la Met puede oxidarse para generar diferentes productos (Reacción (11.10)).



11.4 Conclusiones

En todo el capítulo se ha demostrado que la Met puede ser oxidada por procesos fotosensibilizados en presencia de compuestos pterínicos. El mecanismo de oxidación es iniciado por una transferencia de electrones (Mecanismo tipo I), desde el estado excitado triplete de la Mep al estado fundamental del aminoácido. En solución acuosa el estado triplete del derivado pterínico inicia una serie de competencias. Entre las que se puede resaltar la reacción del ${}^3Mep^*$ con un donador de electrones (en este caso la Met), en este paso pueden llevar a la formación del radical anión de la Mep y el radical catión de Met (esta reacción se puede ver más clara en soluciones en ausencia en O_2) (Capítulo 12). El radical anión puede transferir su electrón y formar $O_2^{\bullet-}$ o reaccionar con el radical catión de la Met y llevar a la formación del respectivo dihidroderivado de la Mep (esta reacción se da con mayor rendimiento en condiciones anaeróbicas). Por otra parte, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el radical catión de Met o someterse a la dismutación llevando a la formación de H_2O_2 y O_2 como productos finales.

Se identificó la formación de dos productos de oxidación de la Met debido a la reacción fotosensibilizada inducida por Mep, los cuales son sulfóxido de metionina (MetSO) y metionina sulfona (MetSO₂) que corresponden a la incorporación de uno y dos átomos de oxígeno a la molécula de Met.

Bibliografía

1. Dantola, M. L.; Vignoni, M.; Caparelli, A. L.; Lorente, C.; Thomas, A. ; *Helv. Chim. Acta*; **91**, 411–425 (2008).
2. Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Thomas, A. H.; Caparelli, A. L. ; *Photochem. Photobiol.* **81**, 793 – 801 (2005).
3. Harriman, A.; Mills, A. ; *J. Chem Soc. Faraday Trans. II* **77**, 2111–2121 (1981).
4. Dántola, M. L.; Vignoni, M.; González, C.; Lorente, C. . & Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. ; *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1014–1022 (2010).
5. Davies, M. J. . ; *Biochem. Biophys. Res. Commun*; **305**, 761–770 (2003).
6. Davies, M. J. . ; *Photochem. Photobiol. Sci*; **3**, 17–25 (2004).
9. Lorente, C.; Thomas, A. . ; *Acc. Chem. Res.* **39**, 395–402 (2006).
10. Schallreuter, K. U.; Moore, J.; Wood, J. M.; Beazley, W.; Gaze, D. C.; Tobin, D. J.; Marshall, H. S.; Panske, A.; Panzig, E.; Hibberts, N. A. . ; *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* **4**, 91–96 (1999).
11. Cabrerizo, F. M.; Dantola, M. L.; Thomas, A. H.; Lorente, C.; Braun, A. M.; ; Oliveros, E.; Capparelli, A. L. . ; *Chem. Biodivers* **1**, 1800–1811 (2004).
12. Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Thomas, A. H.; Caparelli, A. L. . ; *Photochem. Photobiol.* **81**, 793 (2005).
13. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Capparelli,; Pokherl, M. R.; Braun, A. M. and O. E. . ; *Photochem. Photobiol Sci* **1**, 421–426 (2002).
14. Cabrerizo, F. M.; Petroselli, G.; Lorente, C.; Caparelli, A. L.; Thomas, A. H.; Braun, A. M.; Oliveros, E. ; *Photochem. Photobiol.* **81**, 1264–1240 (2005).
15. Neverov, K. V.; Mironov, E. A.; Lyudnikova, T. A.; Krasnovsky, A. A.; Kritsky, M. S. . ; *Biochemistry* **61**, 1149–1155 (1996).
16. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Capparelli,; Martinez, G.; Braun, A. M. and O. E. . ; *Photochem. Photobiol Sci* **2**, 245–250 (2003).
17. Zhang, Y.; Gorner, H. ; *Photochem. Photobiol.* **85**, 943–948 (2009).

Capítulo 12: Degradación fotosensibilizada de metionina libre en ausencia de oxígeno

En el capítulo anterior, se presentaron los resultados obtenidos para el proceso de fotosensibilización de Met por Mep en presencia de O_2 ; se identificaron los fotoproductos formados en estas condiciones y se planteó un posible mecanismo de reacción, que puede ser clasificado como fotooxidación tipo I. También se mencionó que para este aminoácido puede ocurrir una reacción en ausencia de O_2 , lo cual es interesante, ya que las reacciones de fotosensibilización presentadas en capítulos anteriores no tienen lugar en condiciones anaeróbicas.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es precisamente estudiar los procesos fotosensibilizados inducidos por Mep que se llevan a cabo sin la participación del O_2 . Análogamente a lo presentado en el capítulo anterior, se realizaron experimentos de irradiación en estado estacionario con soluciones acuosas, conteniendo el aminoácido y el fotosensibilizador. En este caso las soluciones fueron selladas para ser burbujeadas con Ar por un periodo de 20 min aproximadamente, posterior a esto se realizó la irradiación. El análisis fue similar al de las soluciones en presencia de O_2 . La evolución de la concentración de los sustratos se realizó por medidas de HPLC-PDA y la identificación de los productos de la reacción fotosensibilizada fue medida por UPLC-MS (Capítulo 7).

12.1 Evaluación de la capacidad de Mep para fotosensibilizar Met en ausencia de O_2

La evaluación de la irradiación de soluciones acuosas de Mep y Met en ausencia de O_2 a pH 5,5, fue comparada con las soluciones irradiadas en las mismas condiciones pero equilibradas con aire (Aire/Burb). En el Capítulo anterior, se presentaron los cromatogramas en presencia y en ausencia de O_2 , donde se observó una disminución apreciable del fotosensibilizador en condiciones anaeróbicas, además, se analizaron los perfiles de concentración de la Mep en ambas condiciones y se observó que el consumo de Mep es mayor que las soluciones Aire/Burb. Teniendo en cuenta que en ausencia de O_2 no existe fotólisis de la molécula de Mep, los resultados pueden sugerir que existe una reacción fotoquímica que es dependiente de la concentración de O_2 en la solución, en donde la Met y Mep reaccionan y se consumen.

12.1.1 Análisis Cromatográfico

En la Figura 12.1 se presentan los cromatogramas de una solución de Met y Mep a pH 5,5 saturada con Ar, sin irradiar y luego de irradiar 30, 60 y 90 min, utilizando la Fase móvil II y la columna Synergi Polar RP (Capítulo 7). Se puede observar, en el tiempo de irradiación cero la aparición de dos picos, los cuales corresponden a la Met y Mep respectivamente. En las soluciones irradiadas se observó una disminución de los mismos en función del tiempo. Por otra parte, se observó la formación de un nuevo pico con $t_r = 16,5$ min, denominado P_2 , el cual aumenta con el tiempo de irradiación. El espectro de absorción correspondiente a este producto, posee tres bandas, una de mayor energía centrada en 230 nm y una de menor energía centrada en 322 nm, tal como se presentó en la *Sección 11.1.2*, en principio este resultado indicaría que se genera una reducción de la Mep que conlleva a la formación de P_2 , el cual es un producto que coincide con las características espectroscópicas de la H_2Mep .

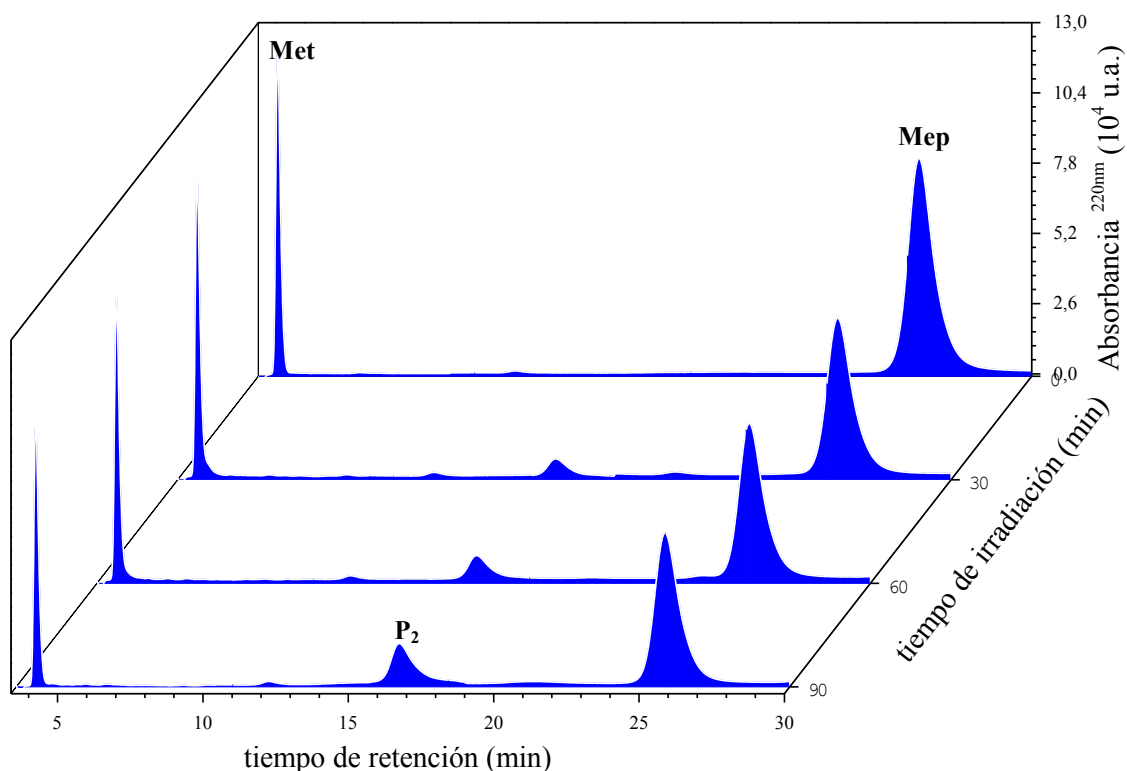


Figura 12.1 Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución anaeróbica (Ar) de Mep y Met; $[Mep]_0 = 110\mu M$; $[Met]_0 = 620\mu M$; $\lambda_{ana} = 220$ nm; pH = 5,5; $\lambda_{irr} = 350$ nm.

Los perfiles de concentración de Mep, Met y P_2 se presentan en la Figura 12.2, donde se observó un consumo de Met menor y el de Mep mayor en comparación con las condiciones en presencia de O_2 .

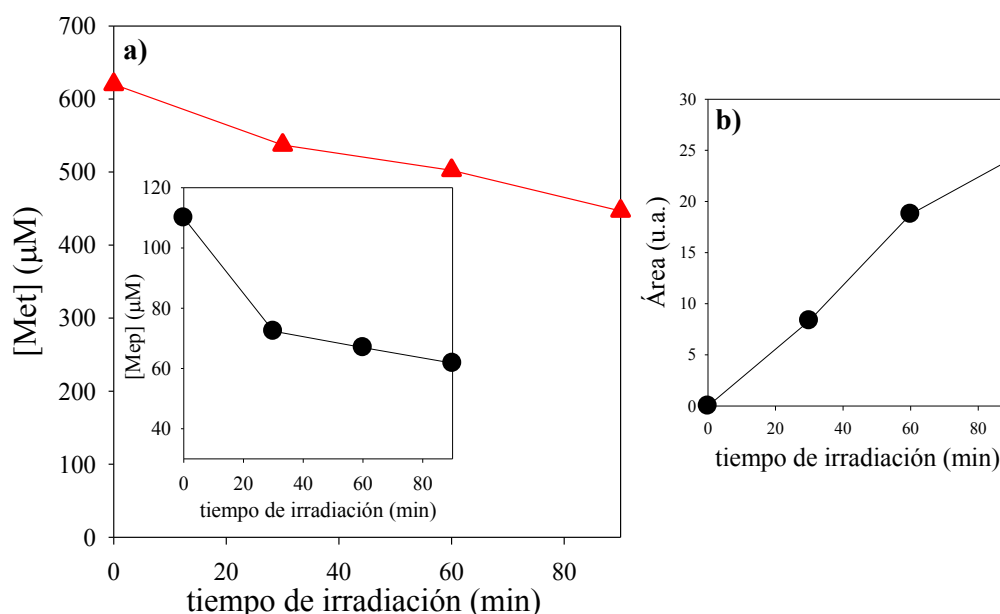


Figura 12.2. (a) Evolución del consumo de Mep y Met en solución acuosa anaeróbica en función del tiempo de irradiación; (b) Formación de P_2 ; $[\text{Mep}]_0 = 110 \mu\text{M}$; $[\text{Met}]_0 = 620 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Met}) = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Mep}) = 340 \text{ nm}$; $\text{pH} = 5,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

12.1.2 Controles

Como se mencionó anteriormente, la Mep en procesos fotosensibilizados, ha sido reportada como fotoestable en condiciones anaeróbicas¹, por lo tanto en este caso era importante descartar, que el consumo observado en presencia de Met, sea debido a una reacción directamente del fotosensibilizador. Para esto se realizaron pruebas en donde se expuso una solución de Mep por diferentes periodos de tiempo, para luego cuantificar el consumo por HPLC-PDA. Los resultados, presentados en la Figura 12.3 (a), no mostraron cambios apreciables en el tiempo, lo que confirma que el consumo de Mep, observado anteriormente es debido a la reacción fotosensibilizada con Met en ausencia de O_2 .

Se realizaron los controles exponiendo la solución de Met a radiación UV-A en ausencia de O_2 , tomando los espectros de absorción en los distintos tiempos de irradiación y se cuantificó la concentración por HPLC-PDA (Figura 12.3 (b)). En las condiciones de trabajo, no se observaron cambios apreciables, ni en los espectros ni en

la concentración del aminoácido y por lo tanto tampoco se observó formación de productos.

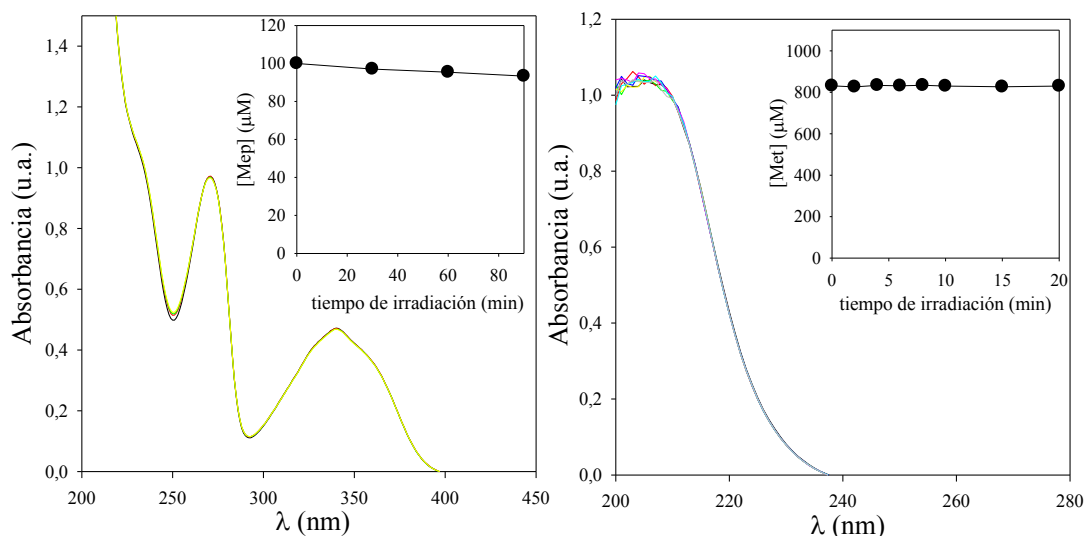


Figura 12.3. (a) Espectros de absorción y evolución de la concentración de Mep en función del tiempo de irradiación, saturadas en Ar en ausencia de Met; $[\text{Met}]_0 = 610 \mu\text{M}$; $[\text{Mep}]_0 = 100 \mu\text{M}$. **(b)** Espectros de absorción de una solución irradiada de Met por distintos periodos de tiempo, saturada con Ar; $[\text{Met}]_0 = 820 \mu\text{M}$.

12.2 Análisis de los fotoproductos

12.2.1 Cromatografía líquida (HPLC)

El producto que hasta el momento se ha propuesto, es posiblemente el dihidroderivado de la Mep, el cual puede ser generado por la reducción del fotosensibilizador en la reacción (Figura 12.1). Teniendo en cuenta que el patrón de H_2Mep es comercial, se tomaron los cromatogramas de una solución irradiada en presencia y ausencia del patrón de H_2Mep , como prueba confirmatoria de la formación del mismo en la reacción. El cromatograma del patrón interno puro mostró un único pico con $t_r = 16,1$ min y un espectro de absorción con tres bandas de energía a 230 nm, 275 nm, 322 nm, respectivamente. Al adicionar este patrón a una solución irradiada de Mep y Met, se observó que el pico con $t_r = 16,1$ min aumentaba, lo cual puede ser una evidencia de la generación de H_2Mep , y además que este producto es generado debido a la reducción que sufre la Mep en ausencia de O_2 .

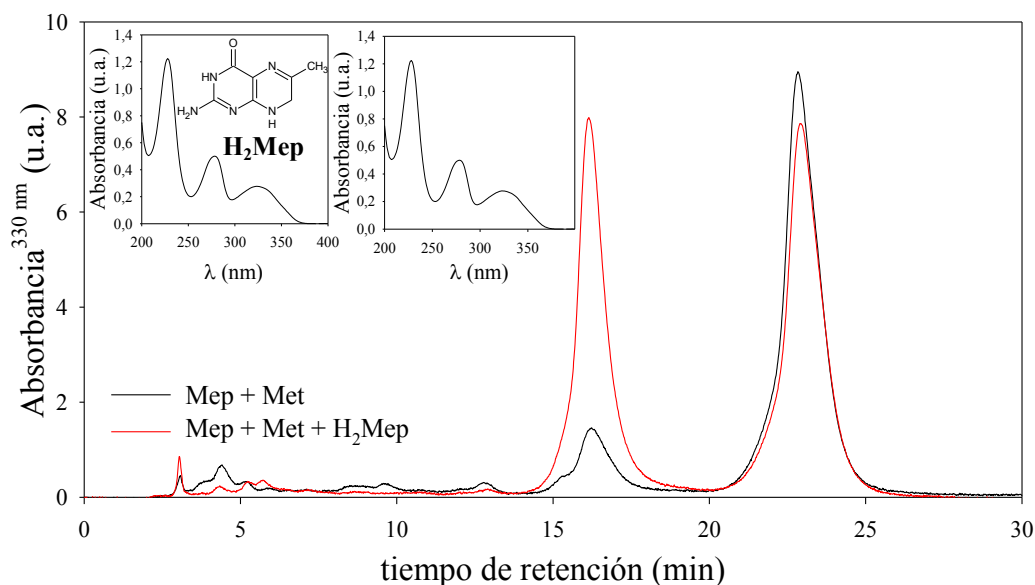


Figura 12.4. Cromatogramas de soluciones irradiadas en presencia y ausencia del patrón de H₂Mep. [Mep]₀=100 μM, [Met]₀=600 μM; λ_{ana} = 330 nm; pH= 5,5.

12.2.2 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

Con el objetivo de investigar los productos de la reacción fotosensibilizada se realizaron pruebas empleando la técnica UPLC-ESI (Capítulo 7). En el capítulo anterior se presentaron los cromatogramas obtenidos con esta técnica de soluciones de Met y Mep irradiadas, pero en este caso se presentaron con previa saturación de Ar.

En la Figura 12.5, se observan los cromatogramas de absorbancia de una solución sin irradiar (Figura 12.5 (a)) y una solución irradiada por 60 min (Figura 12.5 (b)). Se puede apreciar que después de irradiada la muestra aparecen nuevos picos con $t_r = 1,33$ min y 4,56 min que corresponden a P₁' y P₂', respectivamente

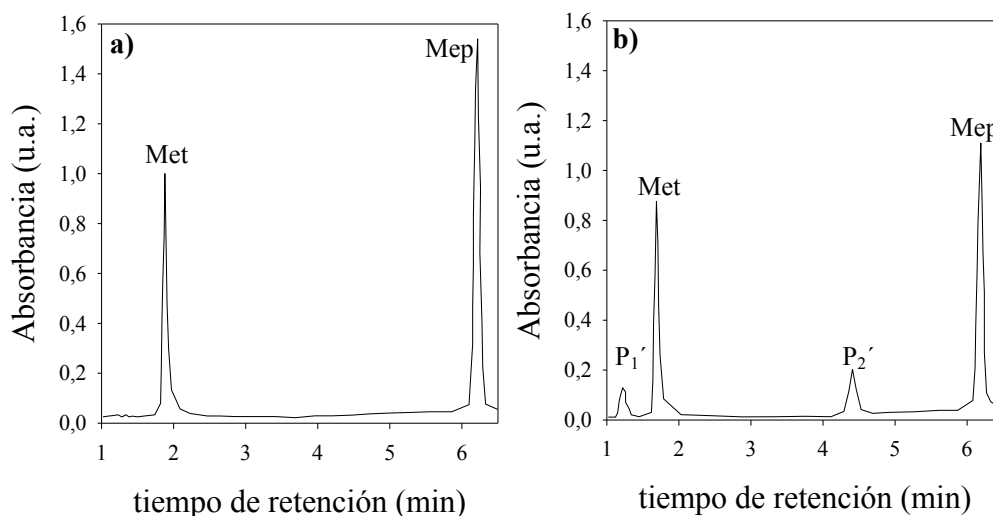


Figura 12.5. Cromatogramas de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O₂. (a) 0 min; (b) 60 min. [Mep]₀= 100μM y [Met]₀ = 600μM; λ_{ana} = 220 nm; pH= 5,5.

Los espectros de masas de los reactivos iniciales, Met y Mep, coincidieron con lo presentado en el Capítulo 11, donde se observó el patrón típico de fragmentación de estos compuestos. En particular la Met mostró un pico $[\text{Met} + \text{H}]^+ = 150,05 \text{ Da}$ ($t_r = 1,95 \text{ min}$) y la Mep $[\text{Mep} + \text{H}]^+ = 178,07 \text{ Da}$ ($t_r = 6,27 \text{ min}$).

Para la identificación de los productos que se forman en ausencia de O_2 , se registraron los espectros de masas de las soluciones fotolizadas de Mep y Met. El espectro de masas del producto P_1' se presenta en la Figura 12.6, en donde aparece la señal del ion molecular $[\text{Met} + \text{O} + \text{H}]^+$ a m/z 166,05 Da, el cual corresponde a la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula de Met. Es importante apreciar que este producto aumenta con el tiempo de irradiación y además la generación de este producto es mucho menor que la producción del mismo en soluciones aireadas, esta generación puede atribuirse al oxígeno residual que queda en la solución durante el tiempo que dura la irradiación.

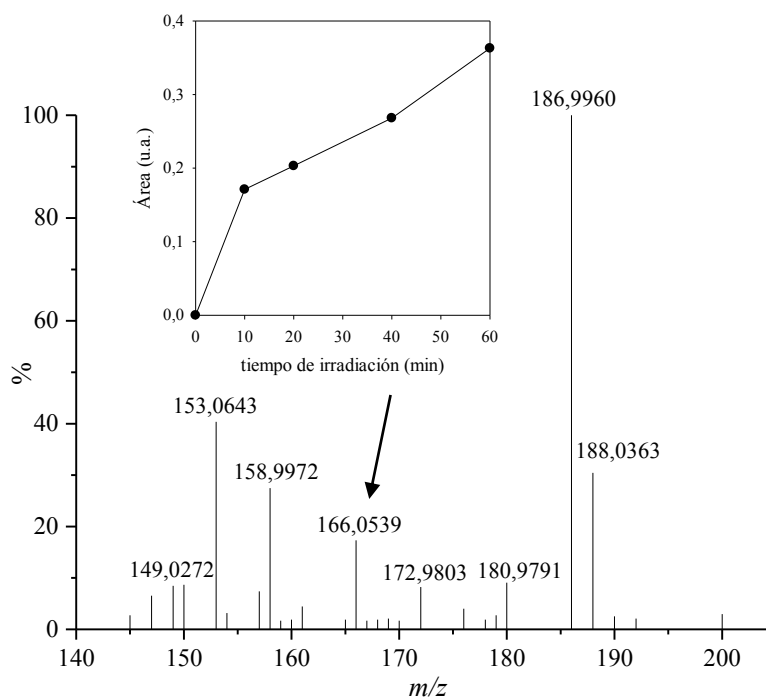


Figura 12.6. Espectro de masas P_1' de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O_2 . Inset: Evolución del P_1' en función del tiempo de irradiación. $[\text{Mep}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{Met}]_0 = 600 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; Modo ESI^+ ; Voltaje = 50 V.

Por otra parte, el producto con $t_r = 4,56 \text{ min}$ presenta un espectro de masa que coincide con H_2Mep , el cual se presenta en la Figura 12.7. Estos resultados confirman que la reacción fotosensibilizada de Mep y Met en ausencia de O_2 , conlleva a la reducción del fotosensibilizador y al mismo tiempo la generación del respectivo dihidroderivado. En la Figura 12.7 (a), se presenta el comatograma de masas, tomado con m/z fijo en 180,08

Da, lo cual indica que se forma un solo pico con esta masa. La gráfica del área bajo curva de este pico en función del tiempo, indicó que este producto aumenta en el tiempo (Figura 12.7 (b)). Con este resultado y el obtenido por cromatografía, se puede confirmar que el producto identificado como P_2' es H_2Mep , lo cual es una fuerte evidencia de la fotoreducción que sufre la Mep en la reacción fotosensibilizada en presencia de Met.

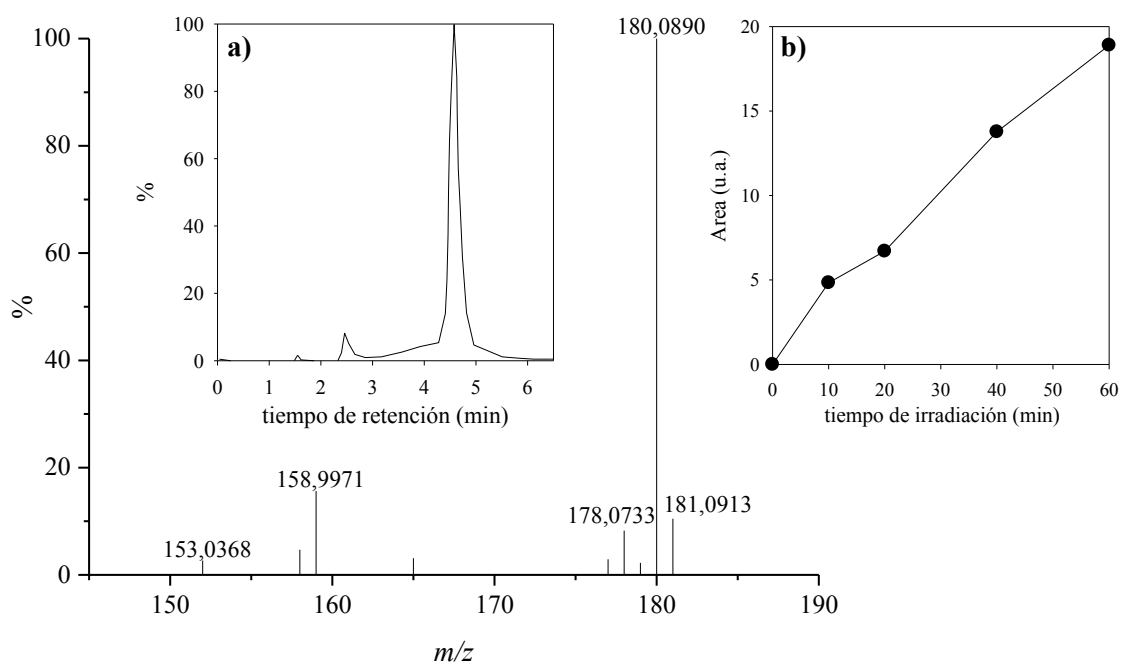


Figura 12.7. Espectro de masas del producto H_2Mep de soluciones irradiadas de Met en presencia de Mep en ausencia de O_2 ; $[Mep]_0 = 100\mu M$ y $[Met]_0 = 600\mu M$; $pH = 5.5$. **(a)** Cromatograma de masas a $m/z = 180,08$ Da. **(b)** Formación del producto en función del tiempo de irradiación.

12.3 Determinación del mecanismo de reacción

12.3.1 Irradiación en presencia de yoduro de potasio (KI)

Análogamente a los experimentos realizados para las reacciones fotosensibilizadas en el capítulo anterior, se realizaron pruebas para investigar la participación de los estados tripletes de la Mep en los procesos fotosensibilizados en ausencia de O_2 . Las fotólisis se realizaron en presencia de KI ($400\mu M$) y en ausencia del mismo.

Los resultados mostrados en la Figura 12.8, muestran claramente un efecto inhibitorio en la velocidad de consumo de ambos reactivos, debido a la presencia de KI. Esto implica que la reacción entre el aminoácido y sensibilizador es iniciada desde el estado triplete. Este efecto también se observó en el consumo de Mep y la formación de H_2Mep .

(Figura 12.8 (b) y (c)). Previamente se ha reportado que la fotoreducción de la Mep lleva a otros productos², además de la H₂Mep, esto puede ser una justificación de que la formación del dihidroderivado en este caso sea relativamente menor.

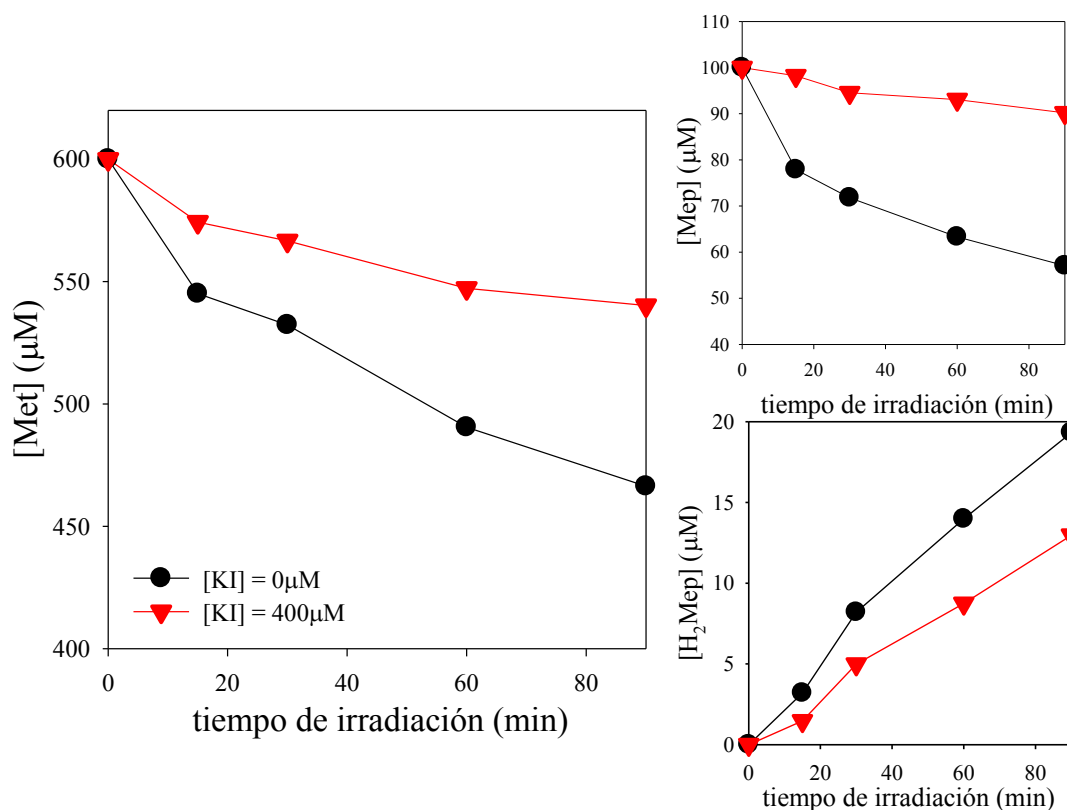
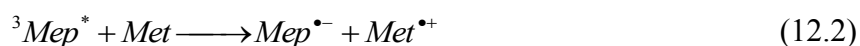
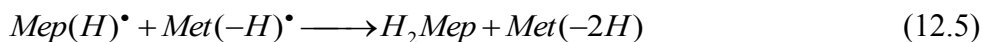


Figura 12.8. (a) y (b) Perfiles de concentración de soluciones de Mep y Met en función del tiempo de irradiación, en ausencia de O₂, en presencia y en ausencia de KI; **(c)** Formación H₂Mep; [Mep]₀ = 100 μM ; [Met]₀ = 600 μM ; [KI] = 400 μM ; pH = 5,5; λ_{irr} = 350 nm; l = 1 cm.

12.3.2 Mecanismo de reacción propuesto

En el presente capítulo se presentaron los resultados del proceso de fotosensibilización de Met inducido por Mep en ausencia de O₂. Se demostró la formación de dos productos, siendo uno de ellos generado en mayor proporción en las condiciones de medida. Por espectrometría de masas se pudo identificar la generación del dihidroderivado de la Mep, que resulta después de la reducción de la Mep. Además, la generación de este producto fue confirmada utilizando como patrón interno una solución de H₂Mep. En experimentos de fotosensibilización de soluciones que contenían Mep y Met libres de O₂ en presencia de KI, confirmó la participación de los estados excitados tripletes en la reacción.





12.4 Conclusiones

Resumiendo lo obtenido en el Capítulo 11 y en el presente capítulo podemos decir que en las soluciones anaeróbicas y aeróbicas, el radical anión de Mep ($Mep^{\bullet-}$) y el radical catión de la Met ($Met^{\bullet+}$) son formados por transferencia de electrones del aminoácido al estado triplete de la Mep ($^3Mep^*$). Estas reacciones dependen de la concentración de O_2 de la siguiente manera:

- ✓ *En soluciones equilibradas con aire*, el radical $Met(-H)^{\bullet}$ es atrapado por el O_2 y compete con las correspondientes formas neutrales ($Met(-H)^{\bullet}$ y $Mep(H)^{\bullet}$). En esta reacción el radical $Mep^{\bullet-}$ es oxidado de nuevo a Mep, y es formado $O_2^{\bullet-}$. Aunque en soluciones equilibradas con aire pueden suceder ambas reacciones, la reacción que predomina es la reacción con O_2 para dar $O_2^{\bullet-}$, porque no hay consumo de Mep y hay eficiente producción de H_2O_2 que resulta de la dismutación de $O_2^{\bullet-}$. Además el radical $Met(-H)^{\bullet}$ se consume, podría ser el que reduce el O_2 a $O_2^{\bullet-}$. Todo este mecanismo lleva a la formación de un producto mayoritario, el cual fue identificado como sulfóxido de metionina (MetSO).
- ✓ *En soluciones saturadas con O_2* , además de la competencia entre el estado triplete de fotosensibilizador, se observó menor formación de H_2O_2 y no se observa consumo de Mep.
- ✓ *En condiciones anaeróbicas*, hay una transferencia de electrones entre el radical neutro $Met(-H)^{\bullet}$ y $Mep(H)^{\bullet}$ lo que conlleva a la formación de H_2Mep y a la oxidación del aminoácido.

Bibliografía

1. Cabrerizo, F. M.; Lorente, C.; Vignoni, M.; Cabrerizo, R.; Thomas, A. H.; Caparelli, A.

- L. . ; *Photochem. Photobiol.* **81**, 793 – 801 (2005).
2. Dántola, M. L.; Vignoni, M.; González, C.; Lorente, C. . & Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. H. ; *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1014–1022 (2010).

PARTE IV

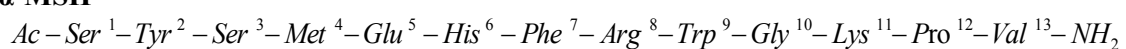
RESULTADOS: DEGRADACIÓN FOTOSENSIBILIZADA DE

AMINOÁCIDOS EN ENTORNO PEPTÍDICO

Capítulo 13: Degradación fotosensibilizada de α -MSH

En este capítulo se presenta el estudio fotoquímico de la reacción fotosensibilizada entre la Ptr y la α -MSH en solución acuosa a pH 5,5, teniendo como objetivos principales evaluar si este fotosensibilizador puede fotoinducir cambios químicos en péptidos con actividad biológica. Como se presenta en el siguiente esquema, la α -MSH contiene en su cadena lineal un residuo de Tyr en la posición 2 y un residuo de Trp en la posición 9, debido a esto, el estudio presentado en este capítulo se centra específicamente sobre estos aminoácidos, para comparar su reactividad en una cadena peptídica.

α -MSH



13.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar α -MSH

Soluciones acuosas de α -MSH a pH 5,5 fueron expuestas a irradiación (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*) en presencia de Ptr. Bajo estas condiciones experimentales sólo la Ptr es excitada (Figura 13.1). Estas soluciones fueron analizadas por espectroscopía *UV-Visible*, *HPLC-PDA/FL*, *fluorescencia* y *UPLC-MS*. El análisis de los resultados se enfocará principalmente, en la reactividad de los residuos Trp y Tyr en la α -MSH, determinando que tipo de mecanismo está involucrado y comparando las reactividades con los aminoácidos libres.

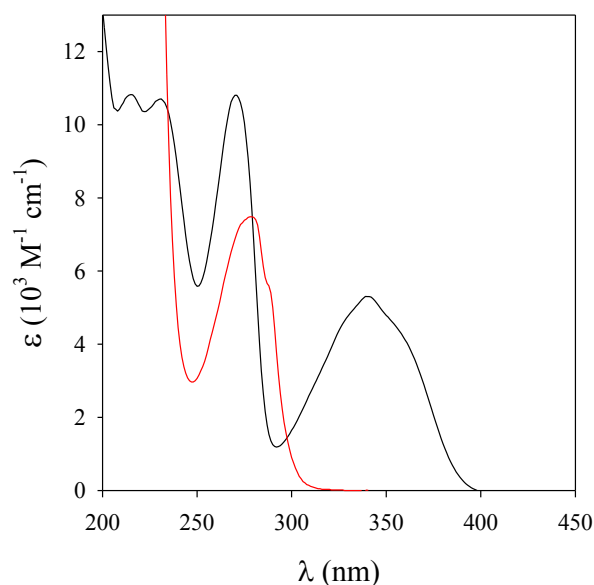


Figura 13.1. Espectros de absorción de Ptr (—) y α -MSH (—) de soluciones acuosas equilibradas con aire a pH = 5,5.

13.1.1 Análisis espectroscópico

En la Figura 13.2 se pueden observar los cambios espectrales de las soluciones fotolizadas que contenían Ptr y α -MSH a pH ácido para distintitos tiempos de irradiación. Se puede apreciar que los espectros de absorción cambian en función del tiempo de irradiación, los cuales son compatibles con los resultados obtenidos en las reacciones de fotosensibilización de Trp¹ y Tyr libres (Sección 9.1.1). Estos resultados sugieren que la hormona sufre cambios químicos cuando es irradiada en presencia de Ptr.

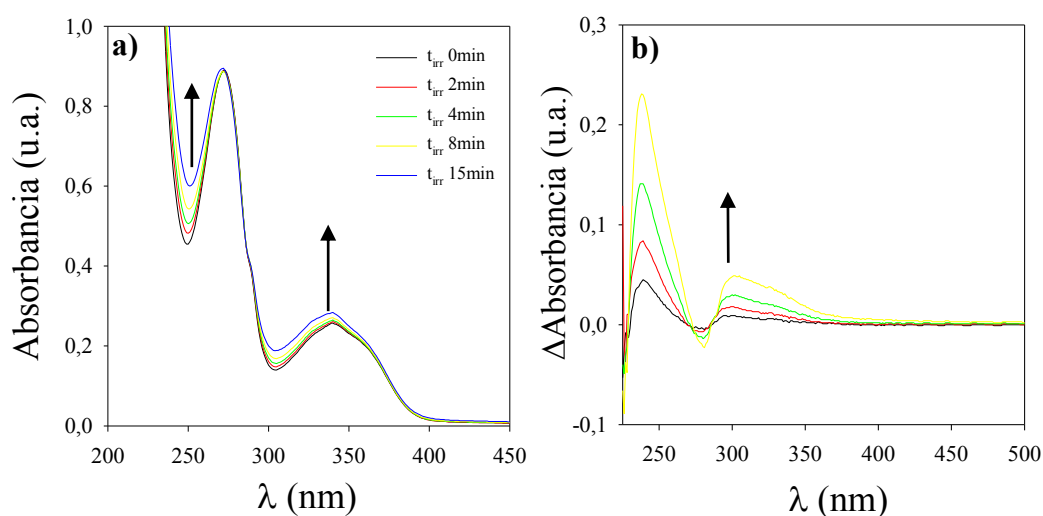


Figura 13.2. (a) Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas. (b) Espectros diferencia; $[Ptr]_0 = 20 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 25 \mu M$; pH 5,5; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

13.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Las muestras irradiadas se analizaron por HPLC-PDA utilizando la Fase Móvil VI y la columna Júpiter Proteo 90A (Capítulo 7). En la Figura 13.3 se observa que el pico correspondiente a α -MSH se separa de la Ptr con tiempo de retención (t_r) 13,6 min y 2,5 min respectivamente.

En los cromatogramas de las soluciones irradiadas se puede apreciar la disminución del pico correspondiente a la hormona, además de la formación de varios picos con t_r menor, los cuales se pueden observar con más detalle en la Figura 13.4. Los picos de los productos generados salen superpuestos por lo cual los espectros registrados no son “puros”, aun así el producto P₁ muestra claramente una banda de absorción por encima de 300 nm, lo cual coincide con los cambios espectrales observados.

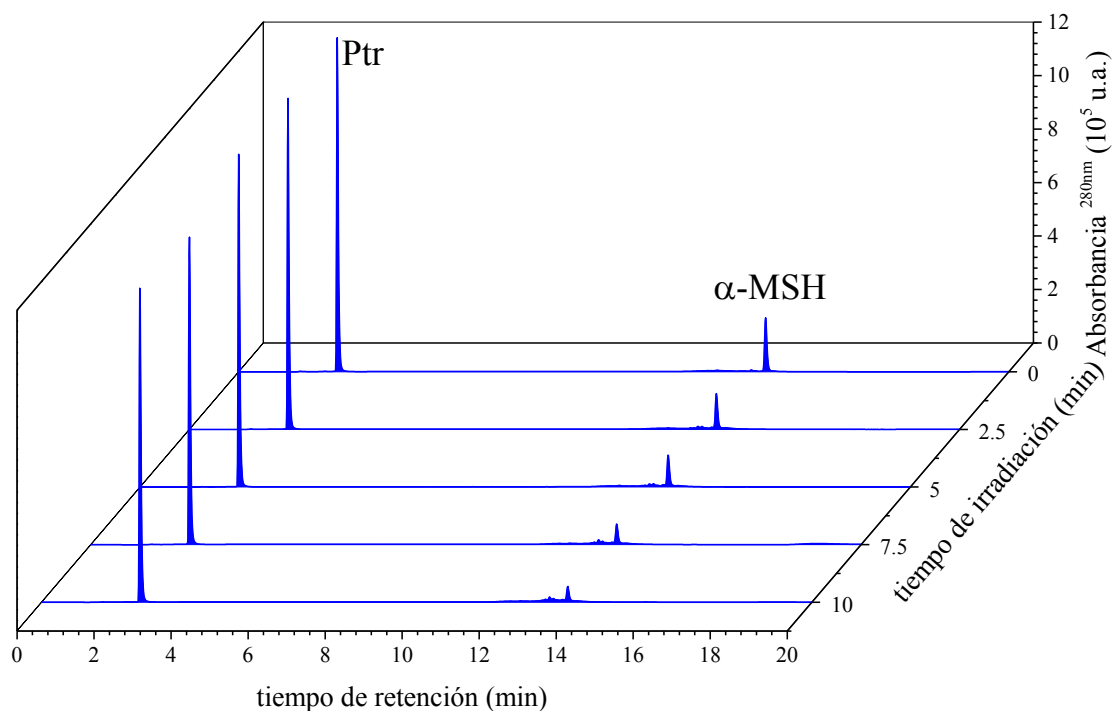


Figura 13.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH equilibradas con aire; $[\text{Ptr}] = 70 \mu\text{M}$ y $[\alpha\text{-MSH}] = 32 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5.5$; $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$.

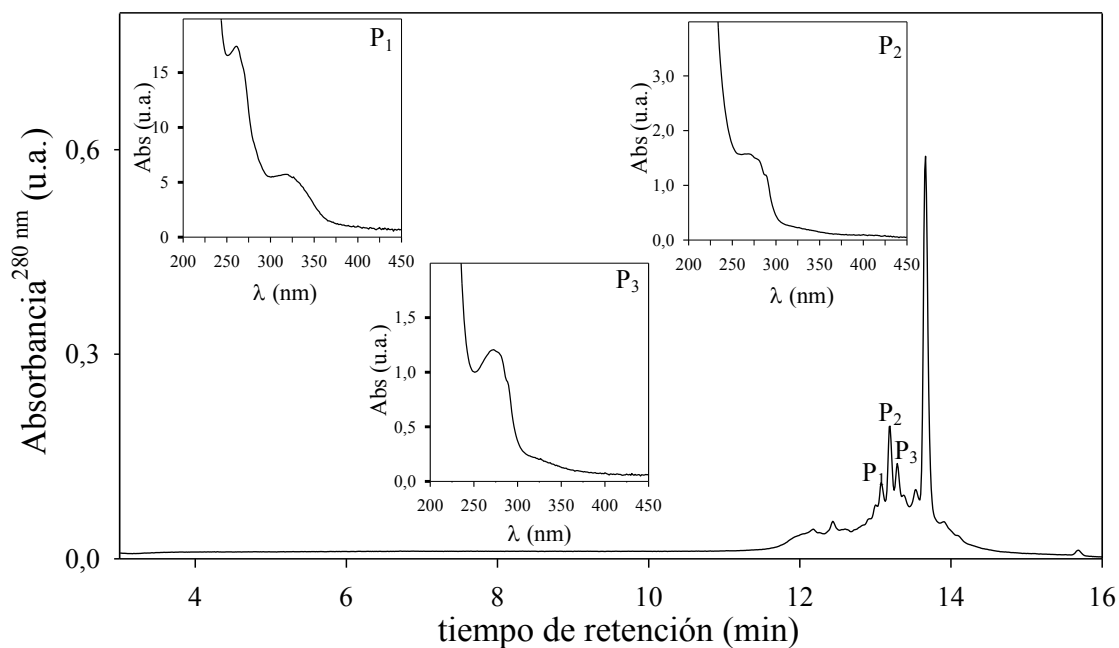


Figura 13.4. Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción (P₁, P₂ y P₃). Insets: Espectros de absorción de los productos generados. $[\text{Ptr}]_0 = 70 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 32 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5.5$; $\lambda_{\text{ana}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$;

Los perfiles de concentración se presentan en la Figura 13.5, donde se observa el decaimiento del péptido en función del tiempo de irradiación, mientras la Ptr permanece constante, demostrando que el α -MSH sufre algún cambio sobre algunos de sus residuos bajo irradiación en presencia de Ptr. Además de esto, se observó la generación de H_2O_2 , como se puede observar en la Figura 13.5.

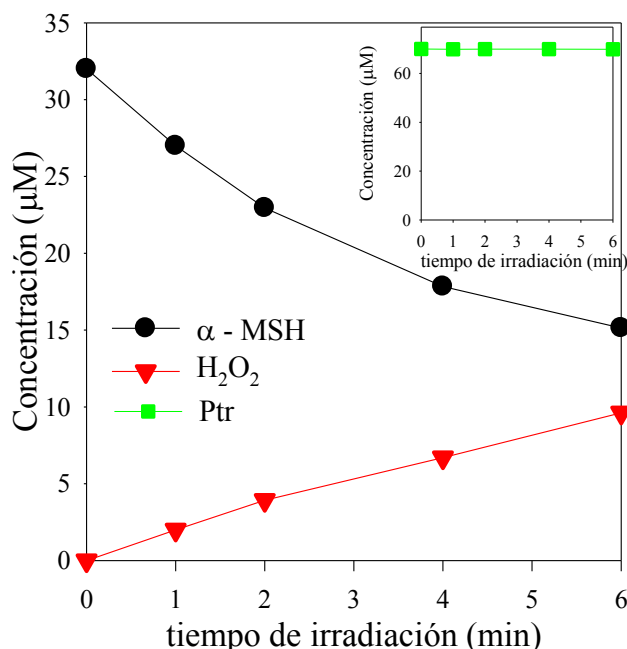


Figura 13.5. Evolución de la concentración de α -MSH, Ptr y H_2O_2 en solución acuosa equilibrada con aire en función del tiempo de irradiación; $[Ptr]_0 = 70 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 32 \mu M$; $pH = 5,5$; $\lambda_{ana}(\alpha\text{-MSH}) = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{ana}(Ptr) = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$.

Teniendo en cuenta los reportes que se han hecho sobre la fotosensibilización de Trp por Ptr¹ y que el Trp es susceptible a una variedad de agentes oxidantes, es de esperarse que el residuo de Trp que está en la secuencia de α -MSH sea afectado por el proceso fotosensibilizado. Una de las características principales del Trp, es su emisión fluorescente, es decir cuando el aminoácido libre absorbe radiación a 280 nm presenta una banda de emisión centrada a 355 nm. Por otra parte, es importante tener en cuenta, que dentro de la secuencia de α -MSH, la Tyr también puede absorber radiación a esta longitud de onda (280 nm). Por lo tanto, para asegurar que la emisión observada a 355 nm sea solo del residuo del Trp, se utilizó una condición en donde el residuo de Tyr no absorba radiación y no se registre una emisión superpuesta de ambos residuos.

En la Figura 13.6 (a), se presenta un espectro de emisión de la α -MSH, excitando a 295nm y observando la emisión en el rango de 300 – 500 nm, con un máximo centrado a 355 nm, lo cual coincide con la fluorescencia reportada para Trp. Por lo tanto, en este

caso para realizar el estudio, se trabajó en estas condiciones de excitación y emisión con el fin de asegurar que solo se esté observando la emisión del residuo del Trp. Los resultados presentados en la Figura 13.6, indicaron que a un t_r similar al del péptido (13,6 min) aparece un único pico. El perfil de concentración de este pico, el cual está relacionado con el comportamiento del residuo de Trp en la α -MSH se presenta en la Figura 13.6 (b), en donde se confirma que al menos este residuo es afectado durante la fotosensibilización en presencia de Ptr.

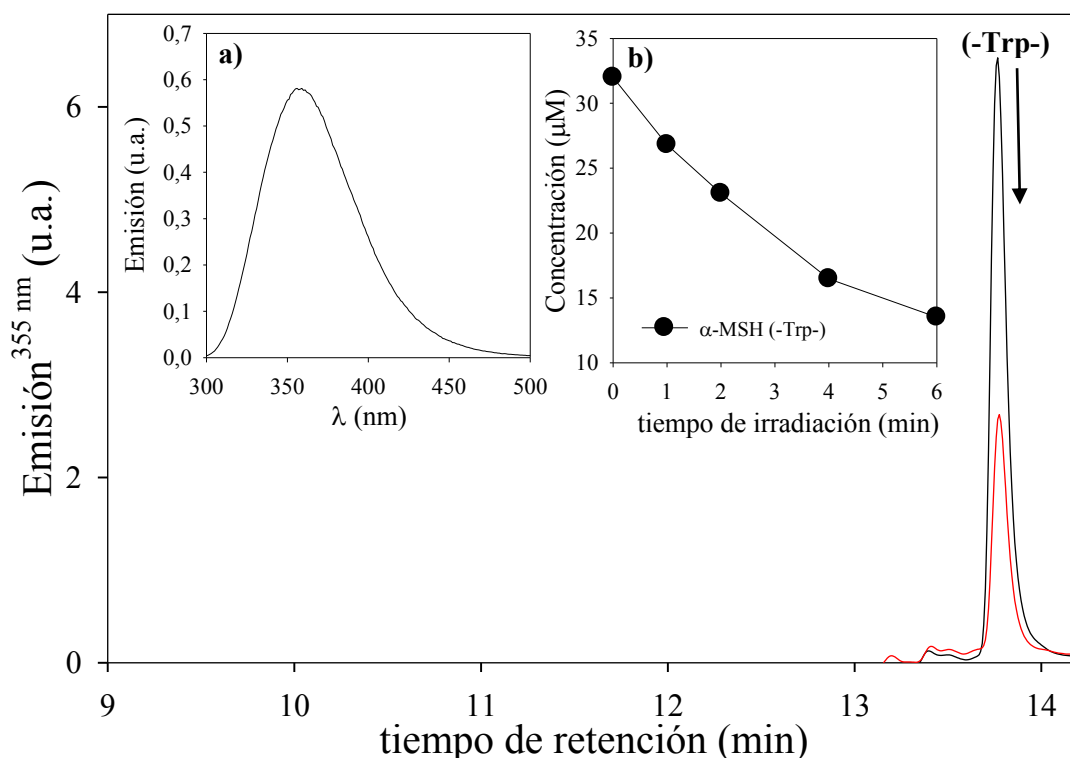


Figura 13.6. Cromatogramas de fluorescencia registrados a distintos tiempos de una solución de Ptr y α -MSH equilibradas con aire; $[\text{Ptr}]_0 = 70 \mu\text{M}$ y $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 32 \mu\text{M}$; pH = 5,5; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$. **(a)** Espectro de emisión del residuo de Trp ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 - 500 \text{ nm}$); **(b)** Evolución de la concentración del residuo de Trp de la $\alpha\text{-MSH}_{Y2G}$.

Por otra parte, otro residuo analizado sobre la secuencia de α -MSH fue la Tyr. Considerando la fluorescencia de este aminoácido, se realizaron pruebas en una condición de emisión, en donde se evite la fluorescencia del residuo del Trp. En este caso las condiciones de emisión fueron $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$. En la Figura 13.7 se pueden observar los cromatogramas de las soluciones irradiadas tomadas con HPLC-FL en estas condiciones. Los resultados mostraron la aparición de un pico con t_r similar al péptido y además emite con estas condiciones, adjudicándole esta emisión al residuo de Tyr que contiene la hormona. El seguimiento de este pico en función del tiempo de

irradiación mostró que el mismo disminuye su área (Figura 13.7), lo que indica que sobre este residuo está ocurriendo alguna reacción que conlleva a su degradación.

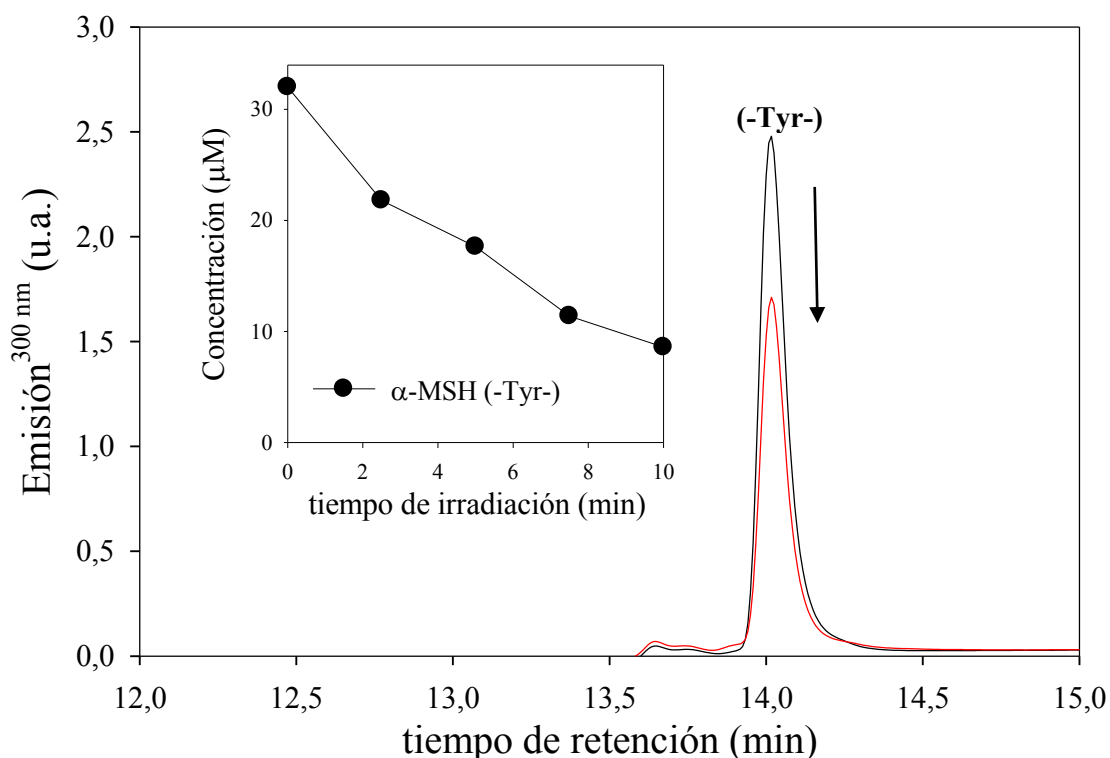


Figura 13.7. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH equilibradas con aire; $[\text{Ptr}]_0 = 70 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 32 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$; Inset: Evolución de la concentración del residuo de Tyr de la $\alpha\text{-MSH}_{\text{Y2G}}$.

13.1.3 Estudios de emisión de fluorescencia

Se realizó un estudio de la emisión de las soluciones irradiadas, aprovechando las propiedades fluorescentes del residuo de Trp, por lo tanto, se tomó el espectro de emisión de las soluciones que contenían Ptr y α -MSH expuestas a radiación UV-A, excitando a 295 nm,. Es importante aclarar que a esta longitud de onda la Ptr absorbe y emite con un máximo centrado en 439 nm, por lo tanto la emisión del fotosensibilizador está parcialmente superpuesta con la emisión del Trp. Sin embargo, como se demostró anteriormente, la concentración de la Ptr permanece constante y la emisión típica del Trp puede ser registrada claramente. Los resultados de las soluciones irradiadas, medidas con las condiciones de emisión del Trp, se presentan en la Figura 13.8, donde se observa un descenso en la emisión del Trp como función del tiempo de irradiación. Este resultado, junto con los observados por cromatografía, es una confirmación que el

residuo de Trp es consumido durante el proceso de fotosensibilización de la α -MSH inducido por Ptr.

Es necesario mencionar que por encima de 390 nm se observa un aumento en la emisión, la cual se le puede asignar a la formación de los dímeros de Tyr (Tyr₂), los cuales emiten con un máximo en 405 nm aproximadamente, sin embargo, la formación de este producto se analizará con más detalle en la próxima sección.

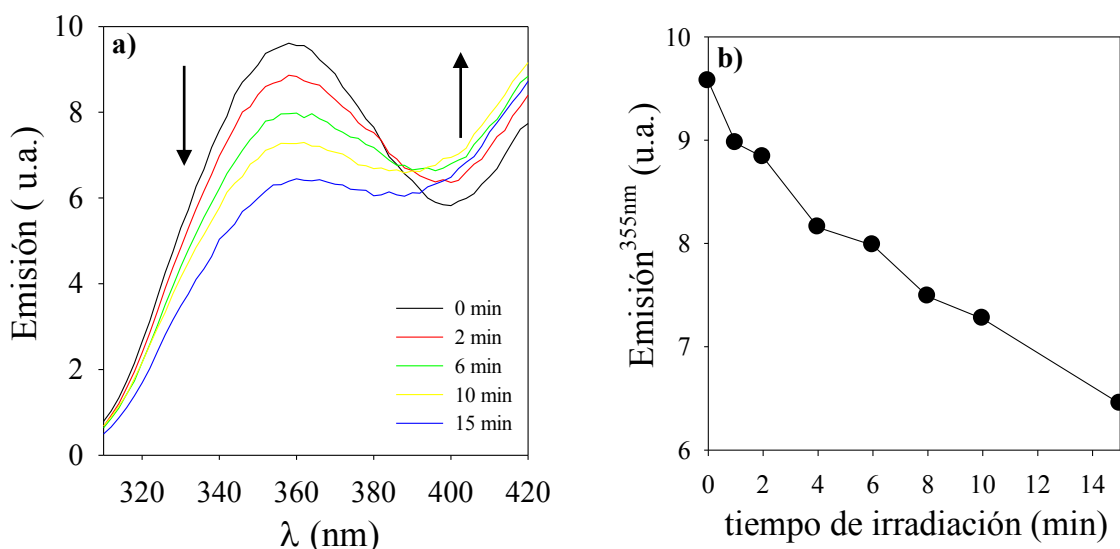


Figura 13.8. (a) Espectro de fluorescencia de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH irradiadas por diferentes tiempos. (b) Descenso de la intensidad de fluorescencia a 355 nm en función del tiempo de irradiación. [Ptr] = 15 μ M y [α -MSH] = 27 μ M; pH = 5.5; λ_{exc} = 295 nm, λ_{em} = 300 – 420 nm.

13.1.4 Controles

Para descartar las reacciones térmicas entre el fotosensibilizador y el péptido se tomaron soluciones acuosas de α -MSH y Ptr en la oscuridad, a temperatura ambiente y se midió el espectro de absorción por distintos periodos de tiempo. En todos los casos se observó que no existen cambios espectrales durante el tiempo que se realizaron las medidas, descartando así una reacción térmica. El segundo control consistió en irradiar soluciones acuosas de α -MSH a 350 nm en ausencia de Ptr, midiendo los espectros de absorción y analizando las muestras por HPLC-PDA. Como era de esperar no se observó ningún cambio ni variación en la concentración, lo cual indica que no existe un cambio químico en la hormona.

13.2 Análisis de fotoproductos

13.2.1 Cromatografía líquida (HPLC)

Reportes previos han demostrado que uno de los productos de oxidación del Trp es la N-formil quinurenina (NFK)². Por otra parte, se ha sugerido que la NFK es un producto de la fotosensibilización del Trp libre por Ptr a través de un mecanismo tipo I¹.

Para investigar esto, se realizó una búsqueda dentro de los productos generados en la reacción fotosensibilizada de Ptr y α -MSH, y se encontró que dentro de estos hay un pico que crece con el tiempo de irradiación y además tiene un espectro de absorción que coincide con el reportado para NFK (Figura 13.9)³.

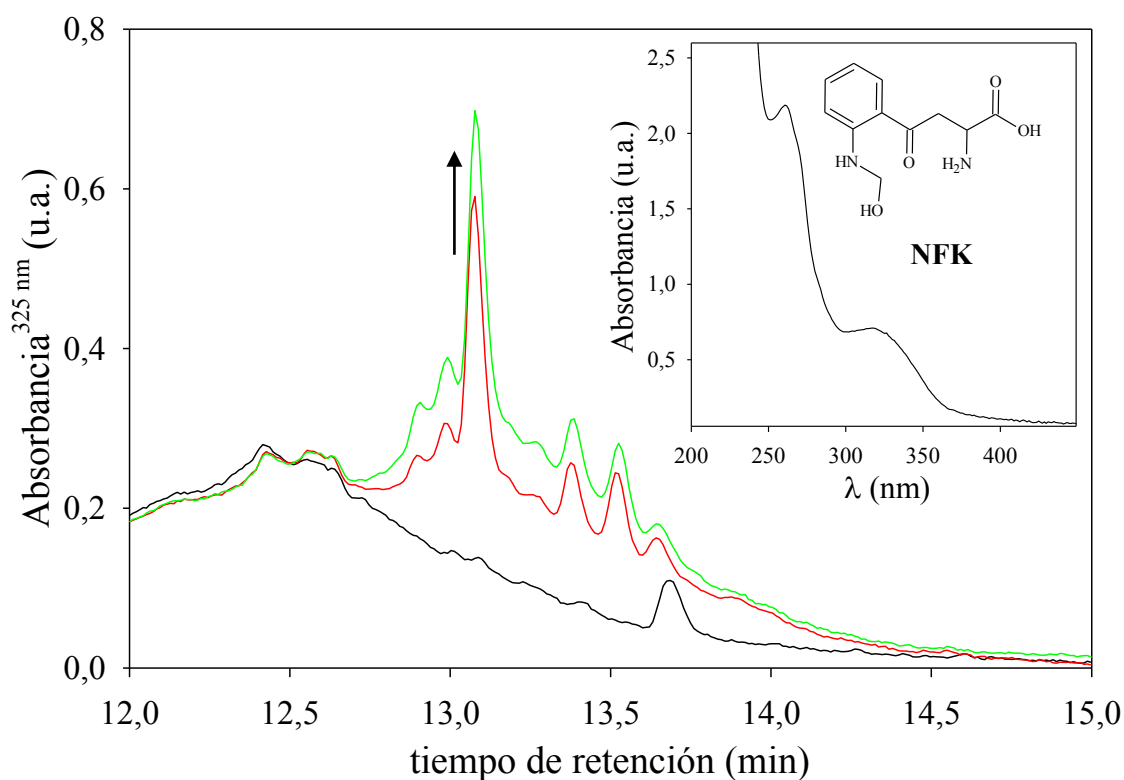


Figura 13.9. Cromatogramas de soluciones irradiadas de Ptr y MSH_{Y2G} equilibradas con aire; [Ptr]₀ = 70 μ M y [MSH]₀ = 32 μ M; λ_{ana} = 325 nm; pH = 5,5. Inset: Espectro de absorción del producto.

Las solución que contenían Ptr y α -MSH fueron expuestas a radiación y se realizaron las medidas de los espectros de emisión con las condiciones de generación de Tyr₂ (λ_{exc} = 310 nm, λ_{em} = 405 nm). Bajo estas condiciones experimentales aparece un pico con t_r levemente mayor al de α -MSH, el cual aumenta en función del tiempo de irradiación hasta los 5 min, después se observa un decaimiento (Figura 13.10, Inset), lo

que concuerda con los resultados obtenidos para la generación de Tyr₂ con Tyr libre (Capítulo 9). Ahora bien, debido a la estructura del radical Tyr, la dimerización puede conllevar a diferentes productos, que previamente han sido reportados⁴, esto puede explicar porque se generan diferentes productos en los cromatogramas por los análisis de HPLC-FL.

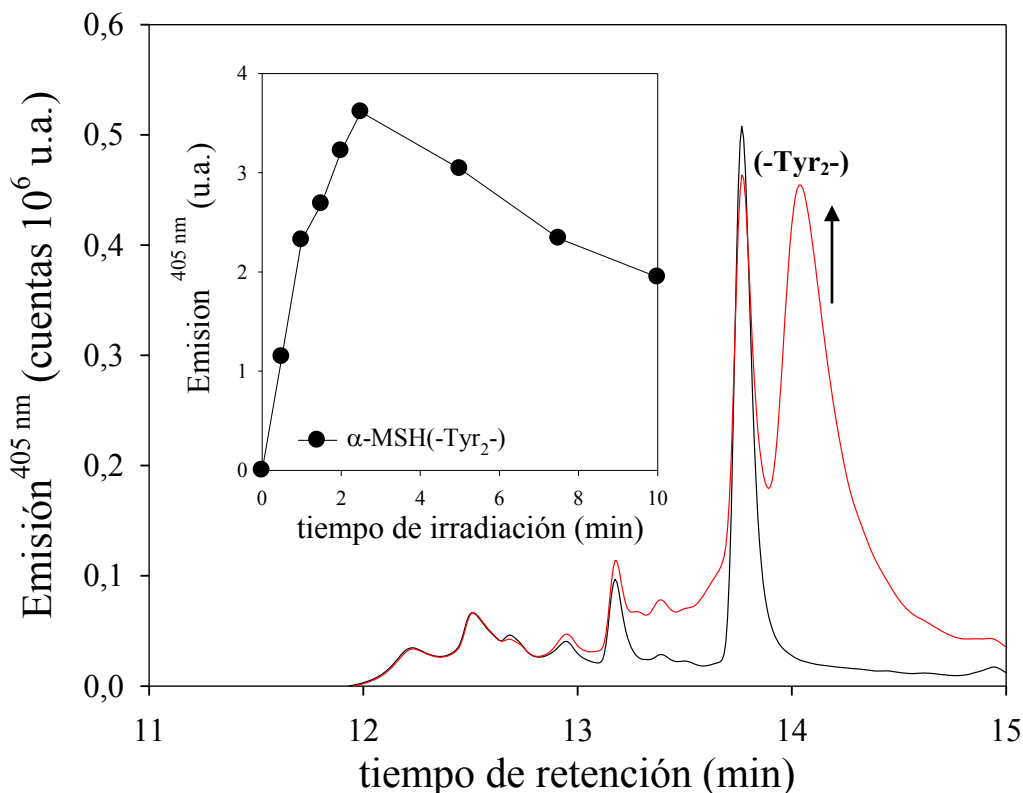


Figura 13.10. Cromatogramas de fluorescencia registrados para soluciones de Ptr y α -MSH equilibradas con aire; [Ptr]₀ = 70 μ M; [α -MSH]₀ = 32 μ M; pH = 5,5; λ_{exc} = 310 nm, λ_{em} = 405 nm; Inset: Evolución de emisión del pico correspondiente a Tyr₂.

13.2.2 Fluorescencia

Se realizaron medidas con el fluorómetro (λ_{exc} = 310 nm, λ_{em} = 320-500 nm) de las soluciones irradiadas y los espectros de emisión son mostrados en la Figura 13.11. Se observó que la emisión de Tyr₂ estaba superpuesta con parte de la emisión de la Ptr, pero como se ha mencionado anteriormente, el fotosensibilizador se mantiene constante en tiempo que se realiza el experimento. Por lo tanto, el cambio en el espectro de emisión es debido a la generación de Tyr₂. Para esto, se restó a cada tiempo de fotólisis, el tiempo de irradiación cero (t_{irr} = 0 min), donde no hay generación Tyr₂. Se puede observar que la banda de emisión coincide con el máximo reportado para los dímeros⁵ y

además que aumenta en función del tiempo de irradiación. Este resultado es una fuerte evidencia a favor de la fotodimerización del residuo de Tyr de la α -MSH inducida por Ptr.

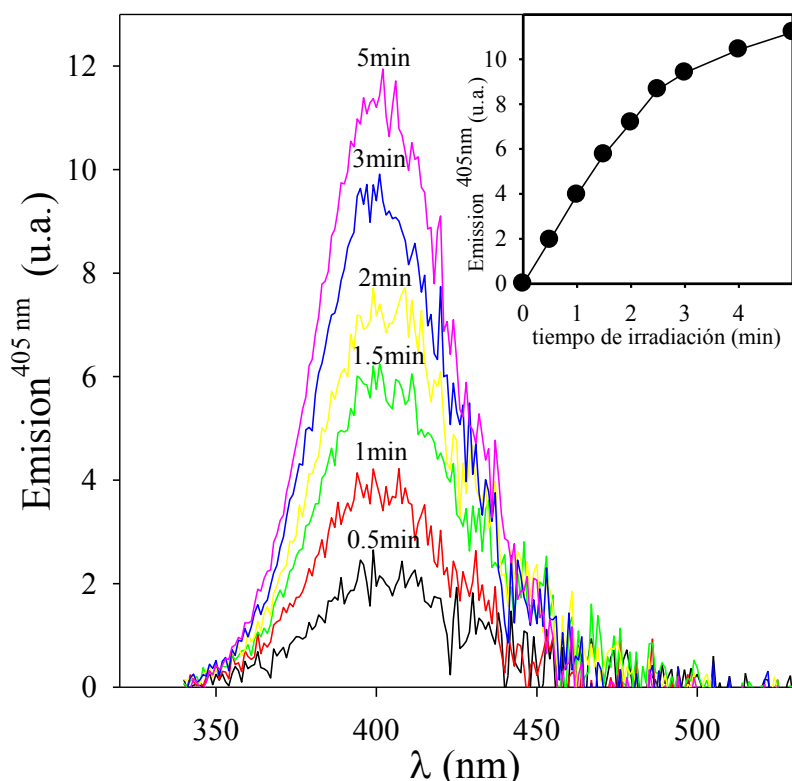


Figura 13.11. Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH irradiadas a 350 nm. Para cada tiempo, fue sustraído el espectro de emisión del tiempo cero. Inset: Evolución de la intensidad de fluorescencia a 405 nm en función del tiempo de irradiación. $[\text{Ptr}]_0 = 15 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 25 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 320 - 500 \text{ nm}$; pH = 5,5.

13.2.3 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

Como complemento a los resultados ya obtenidos por otras técnicas, se realizó un análisis de las soluciones irradiadas que contienen α -MSH y Ptr a pH 5,5 por UPLC acoplado a espectrometría de masas (Capítulo 7).

El análisis cuantitativo de los fotoproductos fue llevado a cabo en modo positivo y modo negativo (ESI^+ y ESI^- respectivamente). Como se esperaba las señales observadas en el $t_{\text{irr}} = 0 \text{ min}$ corresponden al ion molecular intacto de la Ptr como $[\text{Ptr} + \text{H}]^+$ y $[\text{Ptr} - \text{H}]^-$ con relación m/z 164 Da y 162 Da respectivamente. Sin embargo, la resolución fue mucho más clara para ESI^+ que para ESI^- , por lo tanto, todos los resultados presentados en esta parte corresponden al análisis del espectro de masas realizado en modo ESI^+ .

La fórmula molecular de la α -MSH es $\text{C}_{77}\text{H}_{109}\text{N}_{21}\text{O}_{19}\text{S}$ y su peso molecular es 1664,88 Da. Los espectros de masas de α -MSH registrados, muestran un grupo de señales que

corresponden al ion mono-cargado ($m/z \sim 1666$ Da), di-cargado ($m/z \sim 832,9$ Da) y el ion tri-cargado ($m/z \sim 556$ Da); sin embargo, el grupo de señales correspondientes al ion di-cargado es mucho más intenso que el correspondiente ion mono-cargado, por lo tanto las señales se presentan en esta sección serán en el modo di-cargado (Figura 13.12 (a)).

Las soluciones de Ptr y α -MSH expuestas a radiación UV-A fueron analizadas sin previa separación cromatográfico y el correspondiente espectro de masas fue comparado con el obtenido antes de irradiar.

Los cromatogramas de las soluciones irradiadas mostraron la formación de varios picos. Se realizó la identificación evaluando los espectros de masa de los productos formados los cuales presentaron m/z 840,90 Da, 848,89 Da y 856,89 Da, que corresponden a la incorporación de uno ($[\alpha\text{-MSH} + \text{O}]^+$), dos ($[\alpha\text{-MSH} + 2\text{O}]^+$) y tres ($[\alpha\text{-MSH} + 3\text{O}]^+$) átomos de oxígeno a la hormona, respectivamente (Figura 13.12 (b) y (c)). La evaluación de los cromatogramas de la intensidad producida por los iones que llegan al detector a un valor fijo en función del t_r , mostraron la formación de un solo producto para cada m/z (Figura 13.12, Insets). Además, la integración de cada pico demostró que aumentaban su área en función del tiempo de irradiación. Este mismo comportamiento fue observado para los espectros con los iones monocargados y tri-cargados.

Con todos estos resultados podemos confirmar que las soluciones de Ptr y α -MSH bajo irradiación UV-A son sometidas a fotooxidación. Teniendo en cuenta que se demostró el consumo de los residuos de Trp y Tyr, se puede asegurar que estos residuos están envueltos en la oxidación fotosensibilizada. Específicamente, para Tyr libre, la incorporación de al menos un átomo oxígeno fotoinducido por Ptr fue reportado (Capítulo 9). Igualmente, la fotosensibilización de Trp libre por Ptr conllevan, entre otros productos, hidroxí-triptofano y N-formilquinurenina, los cuales corresponden a la incorporación de uno y dos átomos de oxígeno, respectivamente. Por lo tanto, este resultado puede ser una evidencia de que al menos los residuos de Trp y Tyr están envueltos en la fotooxidación de α -MSH.

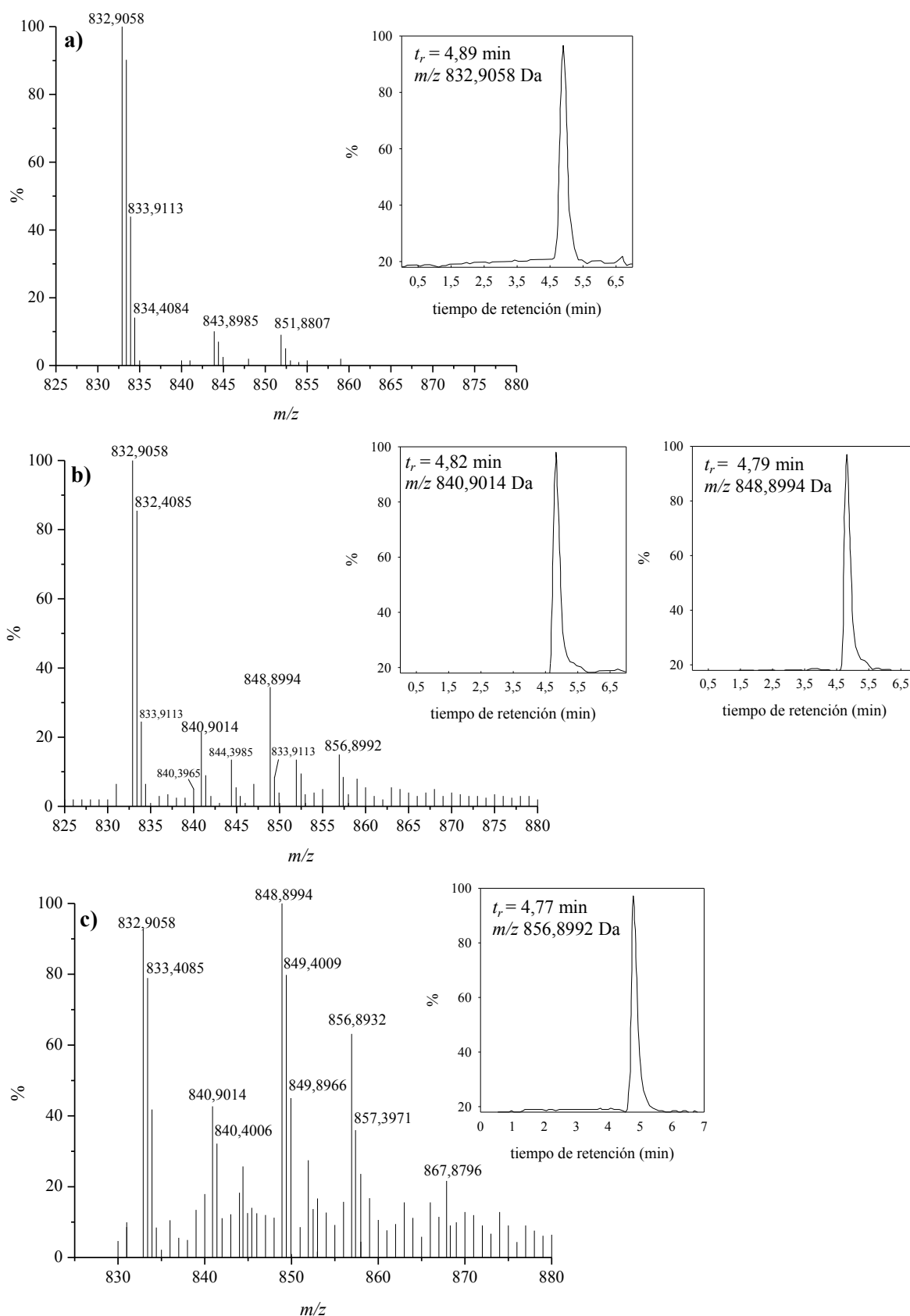


Figura 13.12. (a) Espectros de masa correspondiente al ion intacto de la molécula de α -MSH ($m/z \sim 832,90$ Da). (b) y (c) Espectro de masas de los productos oxigenados ($m/z \sim 840,90$ Da, $848,89$ Da y $856,89$ Da) irradiadas 6, 15 y 30 min respectivamente. Insets: Cromatogramas de MS tomados a m/z fijo. Modo ESI⁺; 50 V; [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH]₀ = 43 μ M; pH = 5,5.

Por otra parte, previamente se encontró evidencia a favor de la formación de Tyr₂ por un proceso fotosensibilizado. Si esto es correcto, el péptido podría someterse a *crosslinking* y productos con peso molecular aproximadamente dos veces el peso molecular de la α -MSH podrían formarse. En particular, el enlace de las dos moléculas del péptido podrían acoplarse por dos Tyr(H[•]) que generan un compuesto con el peso molecular de $[2\alpha\text{-MSH} - 2\text{H}]$. La separación por UPLC demuestra la presencia de al menos un compuesto con $t_r = 4,92$ min, mas alto que $2\alpha\text{-MSH}$, el cual sugiere la formación de compuestos mas grandes que el ion intacto. En los análisis de los espectros de masas de este compuesto, el ion monocargado con peso molecular aproximadamente del doble al peso de la α -MSH podría no ser detectado, lo cual es logico considerando que el grupo de señales correspondiente al ion monocargado del péptido intacto no es intenso. Sin embargo, se identifico una $m/z \sim 830$ Da, el cual corresponde a dos cargas por molecula de péptido, lo que es compatible con $[2\alpha\text{-MSH} - 2\text{H}]$ que se puede observar en la Figura 13.13. Este producto no fue detectado en las soluciones previas a la irradiación.

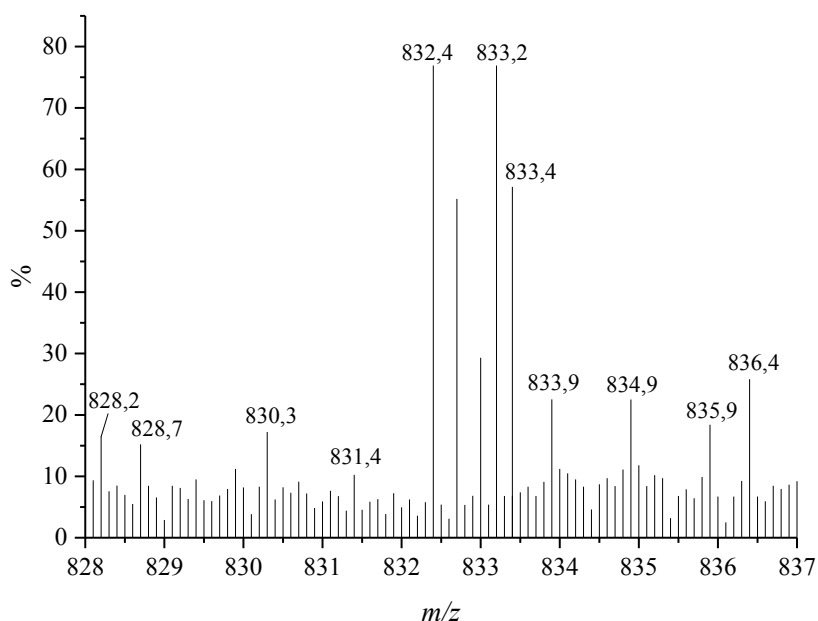


Figura 13.13. Espectros de masas de producto dimérico con la masa de $[2\alpha\text{-MSH} - 2\text{H}]$. La muestra se irradió 15 min y se separó con el equipo de UPLC antes del análisis de masas; Los análisis se realizaron modo ESI⁺; 50 V; [Ptr] = 50 μM ; $[\alpha\text{-MSH}] = 43$ μM ; pH = 5,5.

13.3 Determinación del mecanismo de reacción

13.3.1 Rol del Oxígeno

Como se mencionó anteriormente, los derivados pterínicos actúan como fotosensibilizadores a través de mecanismos tipo I y tipo II. Para comenzar el estudio del mecanismo de reacción que envuelve la fotosensibilización de α -MSH, se realizaron fotólisis en estado estacionario y se determinó la concentración del péptido en cada tiempo de irradiación por HPLC-PDA/FL. Las soluciones se analizaron, teniendo en cuenta la fluorescencia de los residuos de Trp ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$), de Tyr ($\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$) y la generación de Tyr₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$). La evaluación del efecto del O_2 en la reacción entre Ptr y α -MSH, se realizó con pruebas similares a las descritas anteriormente, burbujando Ar y O_2 , por un periodo de tiempo previo a la fotólisis. Los resultados del seguimiento del residuo de Trp y de Tyr se presentan en la Figura 13.14, donde se puede observar que el consumo, de ambos residuos, en ausencia de O_2 no es significativo, además en estas condiciones no se observó la formación de productos. Este resultado es importante porque comprueba que la presencia de oxígeno es fundamental para que ocurra la reacción entre la Ptr y α -MSH.

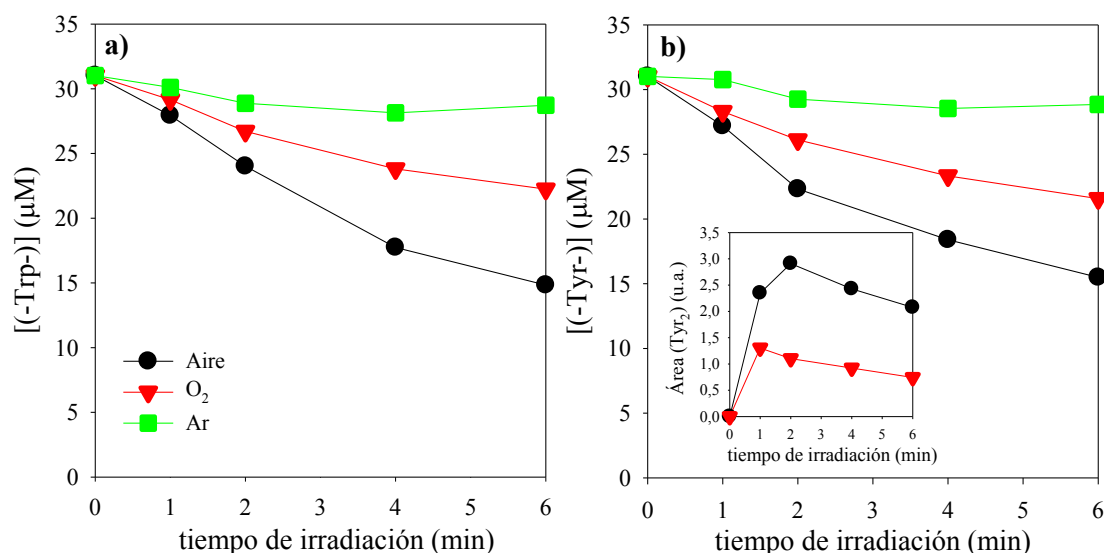


Figura 13.14. Evolución de las concentración de soluciones acuosas equilibras con Aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación. **(a)** Residuo de Trp, ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$), **(b)** Residuo de Tyr, ($\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$). Inset: Formación de Tyr₂, ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$). $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 30 \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

Por otra parte, en condiciones de saturación de O_2 se observó una inhibición en el consumo de ambos residuos, comparado con la degradación de los mismos en soluciones equilibradas con aire. Además, este mismo efecto inhibitorio se observó en la formación de los productos. Este comportamiento se puede justificar con la capacidad que tiene el O_2 para desactivar los estados tripletes de las pterinas⁶, sin afectar los estados excitados singletes de este tipo de compuestos.

13.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Se realizaron pruebas en ausencia y presencia de KI, con el fin de determinar si el estado triplete de la Ptr estaba involucrado. Los resultados mostraron una inhibición en presencia de KI sobre la reacción fotosensibilizada en comparación con las muestras medidas en ausencia del desactivador (Figura 13.15). Esto confirma que los estados tripletes están involucrados y que la reacción es iniciada por este estado excitado. La formación de los productos también sufrió una inhibición en presencia de KI. Este resultado coincide con lo observado con aminoácidos libres.

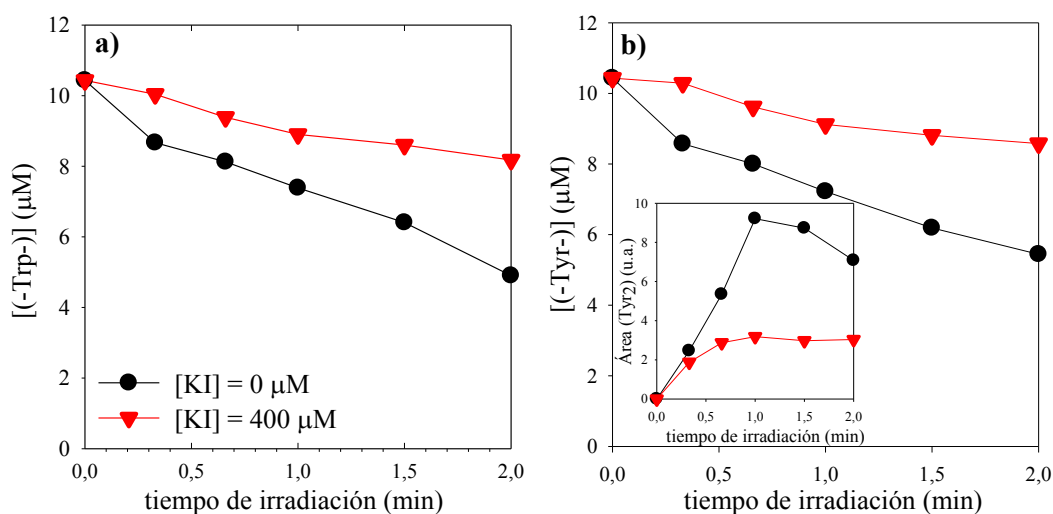


Figura 13.15. Evolución de las concentración de soluciones acuosas equilibras con aire en función del tiempo de irradiación en ausencia y presencia de KI, estimada por HPLC-FL. **(a)** Residuo de Trp, ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 355$ nm), **(b)** Residuo de Tyr, ($\lambda_{exc} = 275$ nm, $\lambda_{em} = 300$ nm). Inset: Formación de Tyr₂, ($\lambda_{exc} = 310$ nm, $\lambda_{em} = 400$ nm). $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 10\mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 100\mu\text{M}$; $[\text{KI}] = 400\mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1$ cm.

13.3.3 Contribución de la oxidación por 1O_2

Las soluciones equilibradas con aire que contenían Ptr y α -MSH, fueron irradiadas en H_2O y D_2O en idénticas condiciones. Los resultados obtenidos por HPLC-FL, se muestran en la Figura 13.16, donde se puede observar que la velocidad de consumo de α -MSH es levemente más rápida en D_2O comparada con la velocidad en H_2O . Este resultado indica que la reacción con 1O_2 está presente en la reacción, pero su contribución en el consumo no es significativa en este sistema. Por otra parte, también se cuantifico la formación de Tyr₂, y se observó que es levemente más rápida en H_2O que en D_2O (Inset Figura 13.16, Inset). Por lo tanto, como se esperaba, el 1O_2 no contribuye a la formación de Tyr₂, incluso en D_2O .

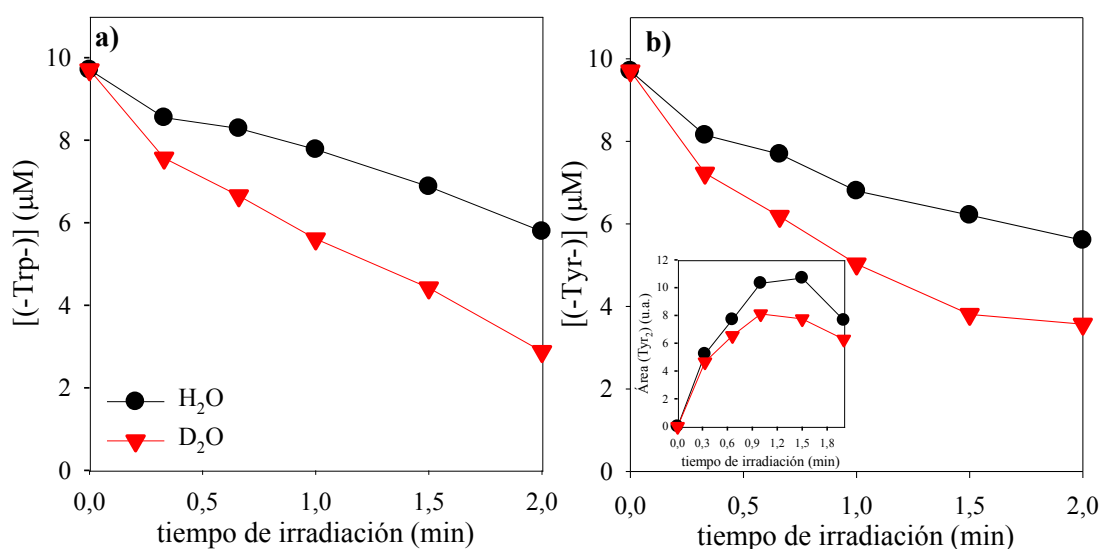


Figura 13.16. Evolución de la concentración de soluciones en H_2O/D_2O irradiadas de α -MSH y Ptr en función del tiempo de irradiación. **(a)** Residuo de Trp, ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 355$ nm), **(b)** Residuo de Tyr, ($\lambda_{exc} = 275$ nm, $\lambda_{em} = 300$ nm). Inset: Formación de Tyr₂, ($\lambda_{exc} = 310$ nm, $\lambda_{em} = 400$ nm). $[\alpha\text{-MSH}]_0 = 30$ μM ; $[\text{Ptr}]_0 = 100$ μM ; pH/pD= 5.5; $l = 1$ cm.

13.3.4 Irradiación en presencia de SOD

Para tener evidencia sobre el efecto que tiene el $O_2^{\bullet-}$ en el mecanismo de reacción, se realizaron experimentos siguiendo el consumo, de los residuos a estudiar por HPLC-FL, en presencia y ausencia de superóxido dismutasa (SOD), como se ha explicado anteriormente.

La velocidad de consumo ambos residuos en presencia de SOD aumentó en comparación con la solución donde no estaba presente la enzima (Figura 13.17). Este

resultado confirma que el $O_2^{\bullet-}$ está participando en la reacción, generando la degradación de α -MSH. Este efecto también se vió reflejado en la formación de los productos en presencia de la enzima, indicando que la generación de los mismos se da principalmente por un mecanismo tipo I.

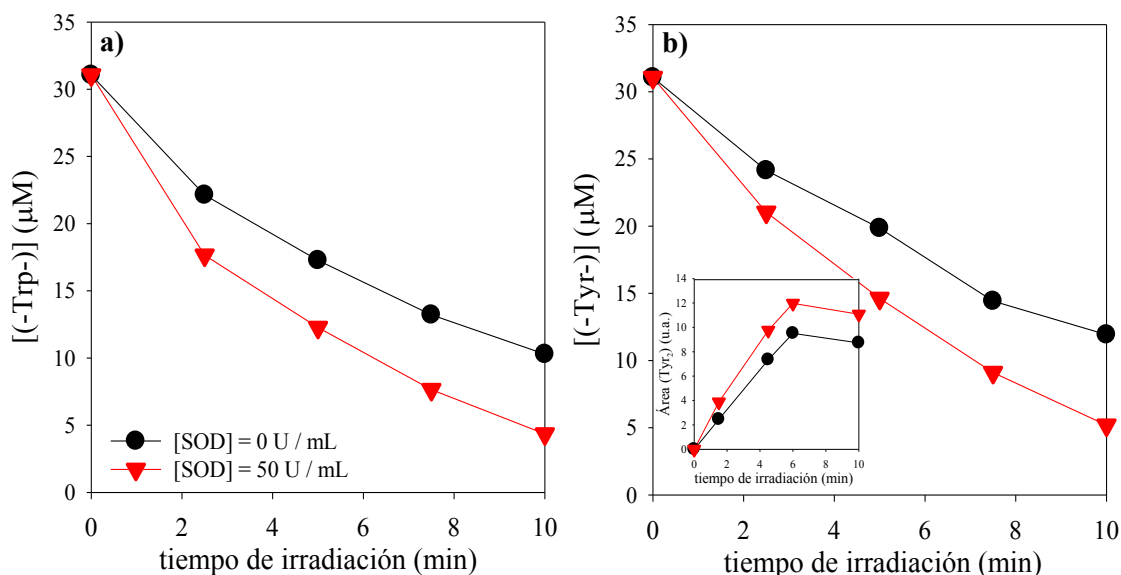
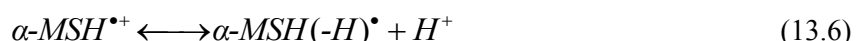
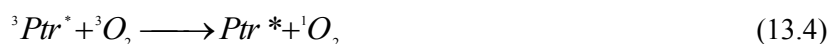
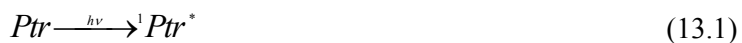


Figura 13.17 Evolución de la concentración de soluciones irradiadas de α -MSH y Ptr en presencia y ausencia de SOD. **(a)** Residuo de Trp, ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 355$ nm), **(b)** Residuo de Tyr, ($\lambda_{exc} = 275$ nm, $\lambda_{em} = 300$ nm). Inset: Formación de Tyr₂, ($\lambda_{exc} = 310$ nm, $\lambda_{em} = 400$ nm). [α -MSH]₀ = 30 μ M; [Ptr]₀ = 100 μ M; [SOD] = 50 U/mL; pH 5,5; l = 1 cm.

13.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

Con todos los resultados presentados anteriormente y los estudios reportados para la fotosensibilización de proteínas y aminoácidos por Ptr, se propone un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones desde el estado fundamental del péptido a estado excitado triplete del fotosensibilizador. La formación del radical se puede resumir así: Después de la absorción de luz por parte de la Ptr, se genera el estado triplete ($^3Ptr^*$) (Reacciones 13.1 y 13.2); para la desactivación de este estado excitado existen tres vías que compiten, la primera es el cruce entre sistemas al estado fundamental (Reacción 13.3), la segunda es la transferencia de energía al oxígeno al estado fundamental llevando a la regeneración de Ptr y la formación 1O_2 (Reacción 13.4) y la tercera es la transferencia de electrones de α -MSH al $^3Ptr^*$ para formar el radical catión (α -MSH $^{\bullet+}$) y el radical anión de la Ptr ($Ptr^{\bullet-}$) (Reacción 13.5), el cual sufre desprotonación al radical neutro (α -MSH $^{\bullet+}(-H)^{\bullet}$) (Reacción 13.6).

La transferencia de electrones de $Ptr^{\bullet-}$ al O_2 regenera la Ptr y forma $O_2^{\bullet-}$ (Reacción 13.7). Este radical puede dismutar en su ácido conjugado HO_2^{\bullet} para formar H_2O_2 (se resume en la Reacción 13.8)



En los experimentos presentados en soluciones equilibradas con aire la velocidad de la Reacción 13.5 es significativa y se observa un importante consumo de α -MSH. Por otra parte, en soluciones saturadas con oxígeno, la reacción 13.4 compite más eficientemente con la Reacción 13.5. La proporción de ${}^3Ptr^*$ que reacciona con α -MSH disminuye, y consecuentemente, la velocidad de consumo de α -MSH también decrece.

El radical libre puede ser generado en los diferentes residuos de aminoácidos, pero en este capítulo se ha demostrado que está localizado al menos en el residuo de Trp y Tyr ($Trp(-H)^{\bullet}$ y $Tyr(-H)^{\bullet}$). En esta parte del trabajo se menciona que a pesar que el Trp tiene más baja energía ionizante, esta no es transferible del radical $Tyr(-H)^{\bullet}$ al $Trp(-H)^{\bullet}$, lo cual podría ser un efecto protector para la Tyr. En el caso de la α -MSH, el tamaño del péptido sugiere que en solución acuosa la molécula es desplegada y por lo tanto la distancia entre los dos aminoácidos envueltos es demasiado larga para que la transferencia ocurra eficientemente. Después, ambos aminoácidos (Trp y Tyr) forman el radical y ambos radicales llevan a productos. Dos procesos químicos fotosensibilizados fueron observados: la oxigenación y la dimerización, el cual se inicia con la generación del $Trp(-H)^{\bullet}$, y este puede oxidarse (Reacción 13.9) y $Tyr(-H)^{\bullet}$ a dimerización (Reacción 13.10) y muy posiblemente a oxidación (Reacción 13.11).



13.4 Conclusiones

Con todos los resultados obtenidos se puede concluir que la oxidación de la hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH) fotosensibilizada por Ptr, conlleva al consumo del péptido y a la vez se genera H_2O_2 , mientras el fotosensibilizador no cambia en el tiempo que dura la irradiación.

El proceso de fotosensibilización lleva a la oxidación de al menos el residuo de Trp y Tyr. Teniendo en cuenta que la Ptr fotosensibiliza la oxidación de estos dos aminoácidos en su forma libre, como se ha reportado anteriormente, se puede suponer la incorporación de átomos de oxígeno en los residuos de Trp y Tyr presentes en la α -MSH. Además, la Tyr₂ fue también observada y por lo tanto la dimerización del radical Tyr fueron detectados en el péptido, lo cual indica que la Ptr podría fotoinducir el *crosslinking* de péptidos.

Las reacciones fotosensibilizadas son iniciadas por la transferencia de electrones desde α -MSH al estado excitado de la Ptr para formar el radical catión (α -MSH^{•+}) y el radical anión (Ptr^{•-}). La transferencia de electrón del Ptr^{•-} al O₂ regenera la Ptr y forma O₂^{•-}, la cual puede dismutar con su ácido conjugado HO₂[•] para formar H₂O₂. El radical en el péptido es localizado al menos en el residuo de Trp y Tyr (Trp(-H)[•] y Tyr(-H)[•]). El Trp (-H)[•] sufre oxidación y la Tyr (-H)[•] dimerización y oxidación. Por otra parte, a pesar que la Ptr produce oxígeno singlete no juega un lugar principal en el mecanismo de reacción.

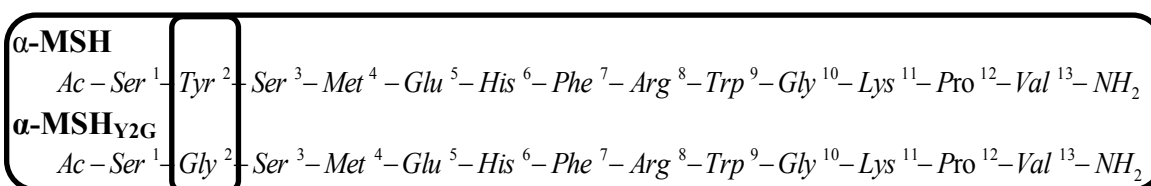
Teniendo en cuenta que la α -MSH estimula la producción de melanina por los melanocitos en la piel y en el cabello y que la acumulación de derivados pterínicos se da en algunas enfermedades de la piel tales como el vitíligo, el daño de esta hormona fotoinducido por Ptr es un resultado importante desde el punto de vista biomédico.

Bibliografía

1. Thomas, A. H. *et al.* ; *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 467–475 (2013).
2. Ronsein, G. E.; Oliveira, M. C. B.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. ; *Chem. Res. Toxicol.*; **21**, 1271–1283 (2008).
3. Yasutsugu, F. ; Yasuhiro, K.; Takashi, I. . F. S. ; *J. Biochem.* **92**, 129–141 (1982).
4. Heinecke, J. W.; Li, W.; Daehnke, H. L.; Goldstein, J. A. ; *J. Biol. Chem.*; **268**, 4069–4077 (1993).
5. Harms, G. S., Pauls, S. W., Hedstrom, J. F. & Johnson, C. K. ., *J. Fluoresc.* **7**, (1997).
6. Denofrio, M. P., Ogilby, P. R., Thomas, H. & Lorente, C. ; *Photobiol. Sci.* **13**, 1058–1065 (2014).

Capítulo 14: Degradación fotosensibilizada de triptófano en entorno peptídico

En el capítulo 13, se demostró que el péptido α -MSH puede ser oxidado por Ptr mediante un proceso fotosensibilizado que ocurre principalmente a través de un mecanismo tipo I. La molécula de α -MSH tiene varios aminoácidos oxidables, de los cuales, al menos Trp y Tyr son modificables químicamente por fotosensibilización con Ptr. Sin embargo, el estudio de las reacciones sufridas, por ambos aminoácidos y sus productos, es difícil debido a las características espectroscópicas de cada uno. Para esto se decidió eliminar sobre la cadena peptídica de la α -MSH los aminoácidos Trp y Tyr. En este capítulo se estudió el residuo de triptófano (-Trp-), para esto se mutó, sobre la secuencia de la α -MSH, el residuo de tirosina (Tyr) en la posición 2 por un aminoácido que no fuera susceptible a la oxidación, en este caso se eligió la glicina (Gly), el péptido mutado de esta manera será denominado α -MSH_{Y2G}. De esta forma se puede analizar específicamente la reactividad y los cambios sufridos por el residuo de Trp.



14.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar α -MSH_{Y2G}

En este capítulo se presentan resultados de los experimentos en los cuales se irradiaron soluciones acuosas a pH 5,5 (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*) conteniendo α -MSH_{Y2G} como sustrato y Ptr como fotosensibilizador. Estas soluciones fueron analizadas por espectroscopia *UV-Visible*, *HPLC-PDA/FL*, *fluorescencia* y *ULPC-MS*. El espectro de absorción de α -MSH_{Y2G} es dominado por la absorción del Trp (Figura 14.1) y como es lógico no absorbe radiación en la región UV-A.

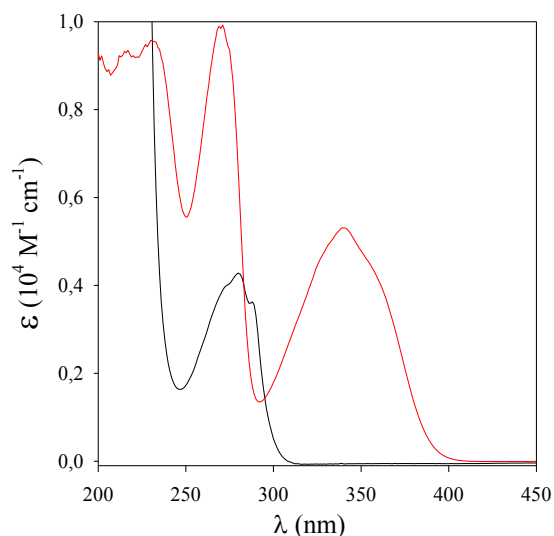


Figura 14.1. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de α -MSH_{Y2G} y Ptr a pH=5,5.

14.1.1 Análisis espectroscópico

En la Figura 14.2 se puede observar el cambio en los espectros de absorción en soluciones que contenían α -MSH_{Y2G} y Ptr para distintos tiempos de irradiación. Se aprecia claramente que hay un aumento de la absorbancia en función del tiempo de irradiación, en particular se puede resaltar el rango de 300 – 400 nm, lo cual es compatible con los cambios observados para el Trp¹ libre y α -MSH (Capítulo 13).

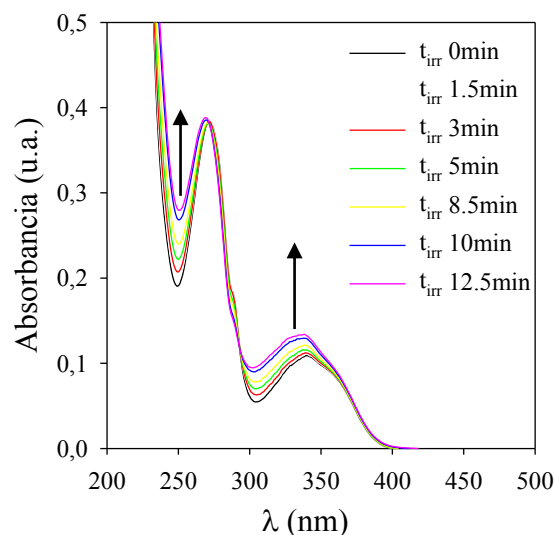


Figura 14.2. Espectros de absorción de soluciones de α -MSH_{Y2G} y Ptr irradiadas por diferentes períodos de tiempo. [Ptr]₀=20 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀= 40 μ M; pH 5,5; λ_{irr} = 350 nm; l = 1 cm.

14.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Las muestras irradiadas se analizaron por HPLC-PDA/FL utilizando la Fase Móvil VII y la columna Júpiter Proteo 90A, descritas en el Capítulo 7. En la Figura 14.3 se muestran los cromatogramas obtenidos a 280 nm donde se puede observar que en el tiempo cero de irradiación aparece un pico a $t_r = 28$ min, el cual corresponde a α -MSH_{Y2G}. En los cromatogramas de las muestras irradiadas se observó una disminución del área de este pico y además se aprecia la aparición de nuevos picos con $t_r = 3,8$ min, 8,2min y 11,7 min, denominados por el momento P₁, P₂ y P₃ respectivamente. Es importante aclarar que en estos cromatogramas no se presenta el pico de la Ptr, debido que la misma sale con el frente del solvente. A pesar de esto, se hicieron controles donde se observó que no había descenso en el área del fotosensibilizador.

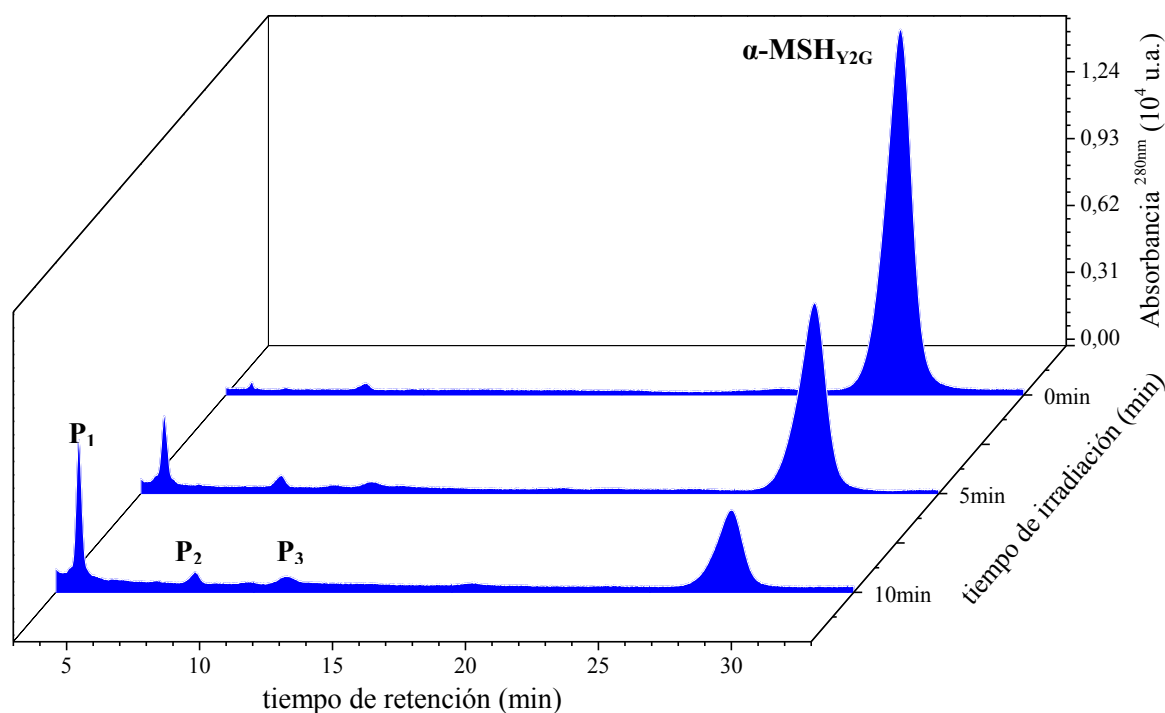


Figura 14.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibrada con aire. $[Ptr]_0 = 48 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{irr} = 350$ nm; $\lambda_{ana} = 280$ nm.

En la Figura 14.4 se presentan los perfiles de concentración del péptido y Ptr donde se puede observar el decaimiento en la concentración de α -MSH_{Y2G} en función del tiempo de irradiación, mientras la concentración del fotosensibilizador permanece constante,

demostrando que existe un proceso fotosensibilizado donde la α -MSH_{Y2G} se está degradando en presencia de Ptr. Por otra parte, en todos los cromatogramas de las muestras irradiadas el pico de la α -MSH_{Y2G} se mantiene puro, sugiriendo que no se generan productos con el mismo t_r , por lo tanto, se puede asumir que el consumo mostrado en la Figura 14.4, es propio del péptido. Además de la formación de productos, se observó la generación de H_2O_2 , como se puede observar en la Figura 14.4.

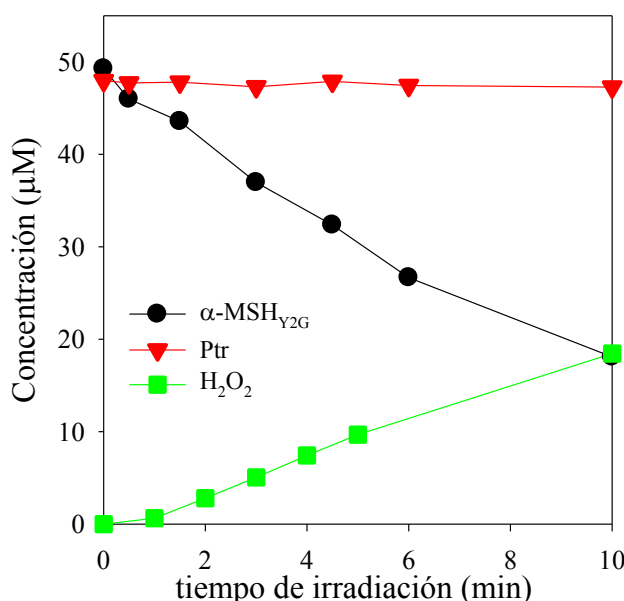


Figura 14.4. Evolución de la concentración de α -MSH_{Y2G}, Ptr y H_2O_2 de soluciones acuosas equilibradas con aire bajo irradiación UV-A como una función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 48 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{ana} (MSH_{Y2G}) = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{ana} (Ptr) = 340 \text{ nm}$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

Por otra parte, la fluorescencia del Trp puede ser utilizada como una prueba intrínseca del comportamiento de este aminoácido dentro del péptido. En la Figura 14.5 (a) se presenta el espectro de emisión de la α -MSH_{Y2G}, medido con las condiciones de emisión del residuo de Trp ($\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 300 - 500 \text{ nm}$), donde se observa la banda característica de este aminoácido centrada en 355 nm. Por lo tanto, se tomaron los cromatogramas utilizando el detector de fluorescencia (HPLC-FL), con las condiciones de emisión mencionadas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.5, en donde aparece un pico con $t_r = 28 \text{ min}$, el cual que coincide con el t_r del péptido intacto (Figura 14.3). Después de irradiar las muestras se observa un descenso de este pico, efecto similar al obtenido con el HPLC-PDA, debido a que el cromóforo principal del péptido es el Trp y es el aminoácido más oxidable presente en la cadena

peptídica de α -MSH_{Y2G}. Además se observó la aparición de un pico fluorescente con $t_r = 4$ min, el cual aumenta en función del tiempo de irradiación

Los perfiles de concentración de las muestras irradiadas, siguiendo el consumo del residuo de Trp, se presentan en la Figura 14.5, en donde se observa que el descenso de péptido intacto coincide dentro del error experimental con el consumo del residuo de Trp, demostrando que la oxidación de α -MSH_{Y2G} ocurre al menos sobre este aminoácido.

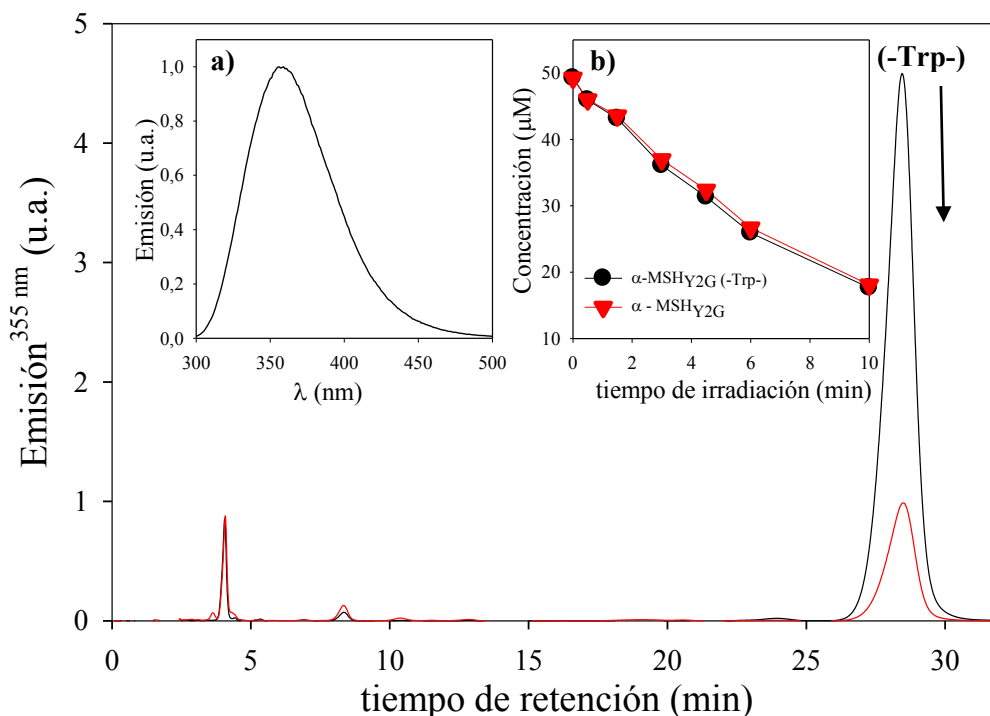


Figura 14.5. Cromatogramas de fluorescencia registrados de soluciones de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibradas con aire a distintos tiempos irradiación. **(a)** Espectro de emisión del residuo de Trp. **(b)** Evolución de la concentración del residuo de Trp y α -MSH_{Y2G}. $[\text{Ptr}]_0 = 48 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 - 500 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; pH = 5,5.

14.1.3 Estudios de emisión de fluorescencia

Se realizaron medidas de fluorescencia, teniendo en cuenta la emisión característica del Trp con el fluorómetro (Capítulo 7). Los resultados mostraron que la intensidad del espectro de emisión de soluciones irradiadas de α -MSH_{Y2G} y Ptr disminuía en función del tiempo de irradiación (Figura 14.6 (a)). Este comportamiento es similar a lo observado por cromatografía, confirmando así que la reacción fotosensibilizada de Ptr y α -MSH_{Y2G} ocurre, en principio, sobre residuo de Trp. Cabe mencionar, que en este caso

no hay un aumento en la intensidad de emisión por encima de 400 nm, como se había indicado para la α -MSH (*Sección 13.1.3*), debido que en este péptido no está presente el residuo de Tyr y por lo tanto no se genera Tyr₂ la cual emite alrededor de 400 nm.

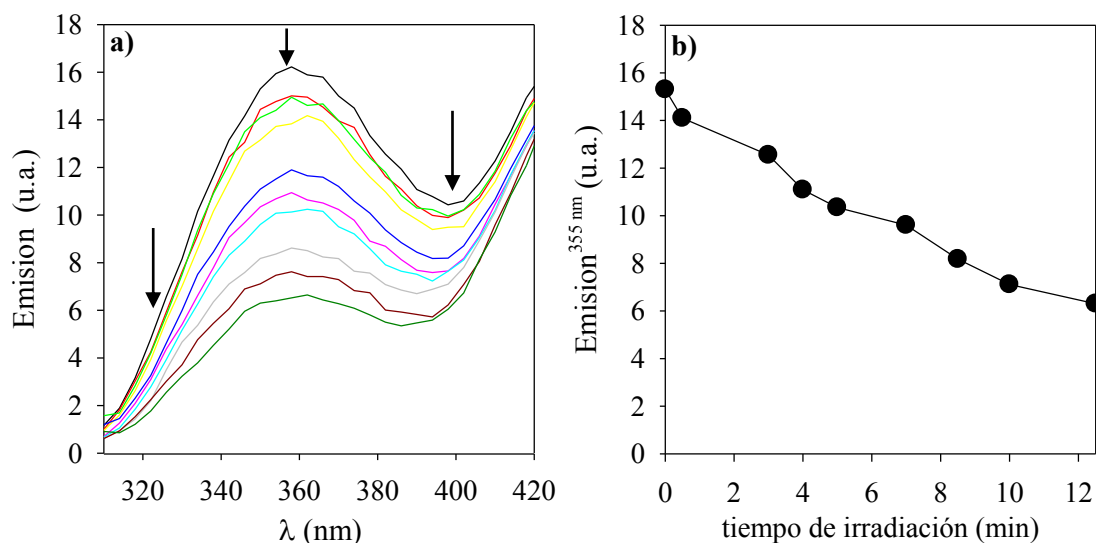


Figura 14.6. (a) Espectro de fluorescencia de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH_{Y2G} irradiadas por diferentes tiempos (b) Descenso de fluorescencia a 355 nm como función del tiempo de irradiación; [Ptr]₀ = 20 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 40 μ M; pH 5,5; λ_{exc} = 295 nm, λ_{em} = 310 - 420 nm; l = 1 cm.

14.1.4 Controles

Se realizaron controles análogos a los llevados a cabo para las reacciones fotosensibilizadas descritas en los capítulos anteriores. En estos controles, como era de esperar, se estableció que no existen reacciones térmicas entre el péptido y la Ptr y además que el péptido no se degrada por irradiación en ausencia de Ptr.

14.2 Análisis de fotoproductos

14.2.1 Cromatografía líquida (HPLC) y análisis de productos aislados

El análisis cromatográfico muestra, al menos la formación de 3 productos con t_r menores al péptido, nombrados por el momento P₁, P₂ y P₃. En la Figura 14.7, se presenta un cromatograma de una muestra irradiada durante 10 min, donde se puede observar, además de la formación de los productos mencionados, los espectros de absorción de cada uno, sacados con el detector HPLC-PDA.

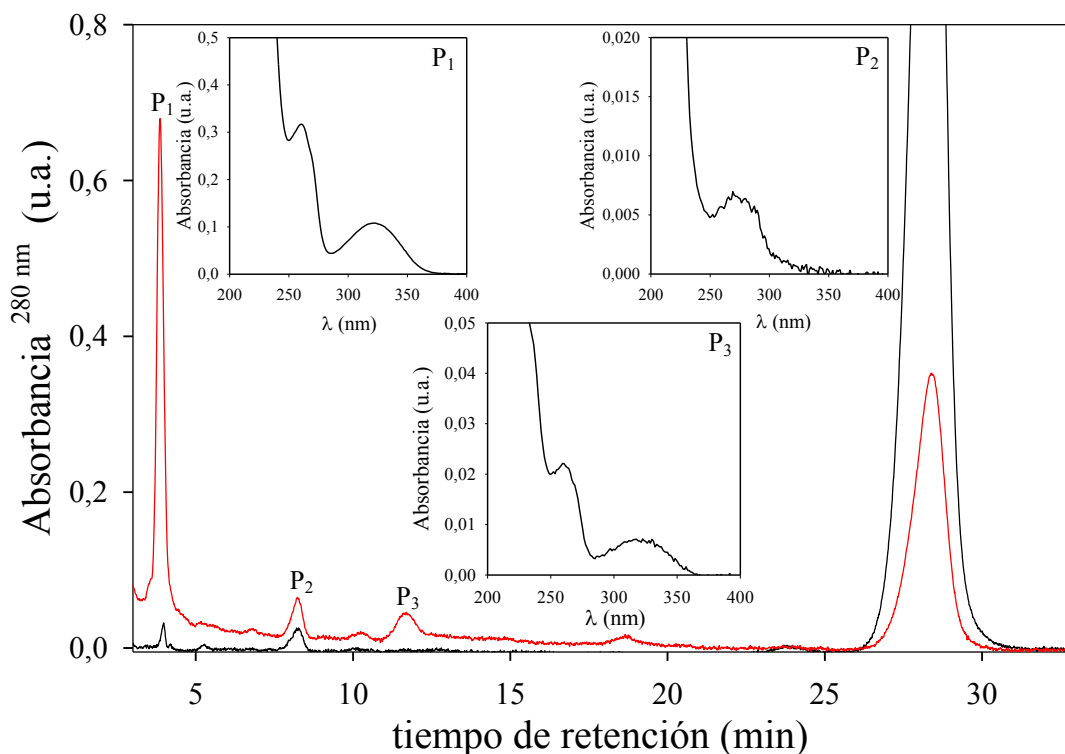


Figura 14.7. Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción (P_1 , P_2 y P_3). Insets: Espectros de absorción de los productos generados. $[Ptr]_0 = 48 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{ana} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$.

Los productos denominados P_1 y P_3 , presentan un espectro con máximos de absorción similares a los reportados para la N-fomil quinurenina (NFK)², el cual es un producto de oxidación de Trp, el cual tiene una emisión característica. Para confirmar la formación de este producto, se tomaron los cromatogramas de las soluciones irradiadas con las condiciones de emisión de la NFK ($\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 434 \text{ nm}$). Los resultados se presentan en la Figura 14.8, donde se observa claramente que ambos productos emiten en estas condiciones y además crecen en función del tiempo de irradiación, lo que podría ser una primera evidencia de la formación de este producto en la reacción fotosensibilizada de Ptr y $\alpha\text{-MSH}_{Y2G}$.

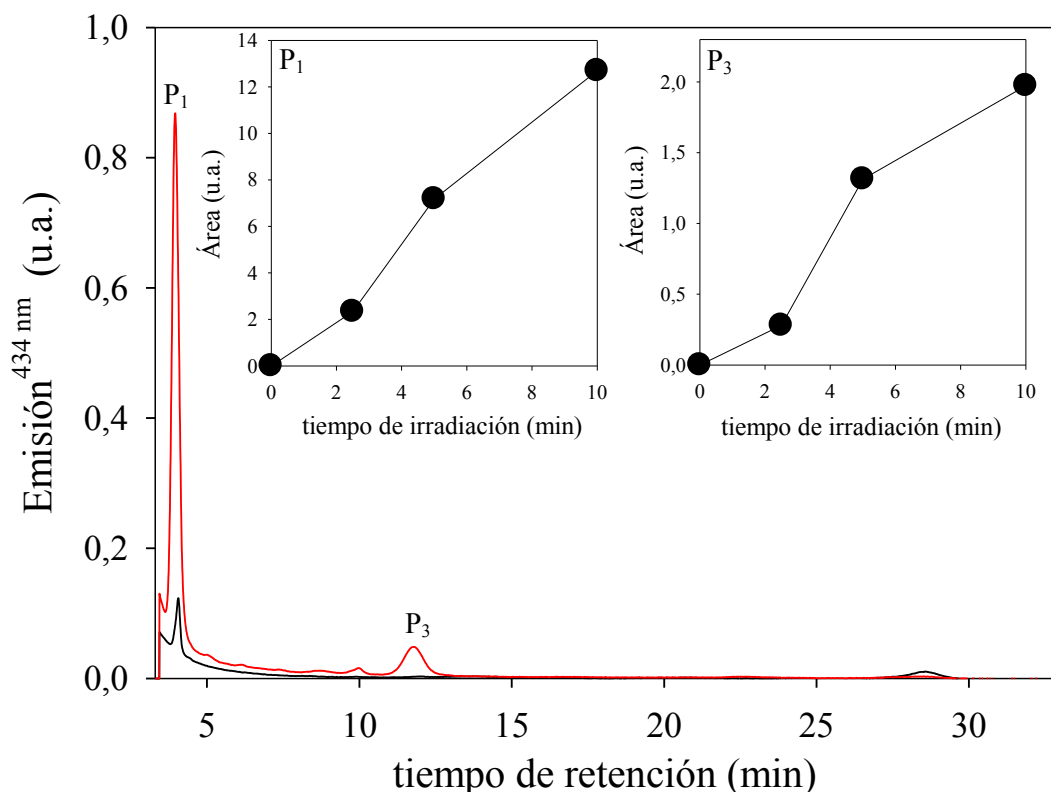


Figura 14.8. Cromatogramas de fluorescencia de soluciones irradiadas equilibradas con aire; Inset: Perfiles concentración de P_1 y P_3 en función del tiempo de irradiación. $[Ptr]_0 = 48 \mu M$ y $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$.

Con el fin de verificar la formación de NFK, se aisló P_1 desde los cromatogramas utilizando HPLC-PDA, para luego tomar el espectro de emisión de producto “puro” con equipo de fluorescencia (Capítulo 7). En la Figura 14.9, se presentan los espectros de emisión del producto aislado, medidos con las condiciones de la NFK ($\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 380 - 500 \text{ nm}$), en donde se observa el aumento en la emisión en función del tiempo de irradiación y además el máximo está centrado en 435 nm, lo cual coincide con lo reportado en literatura para la NFK. Con estos resultados se puede confirmar que la fotosensibilización de $\alpha\text{-MSH}_{Y2G}$ en presencia de Ptr, da como producto de oxidación la NFK. Es importante aclarar que el producto P_3 , no fue posible aislarlo, ya que su intensidad era baja.

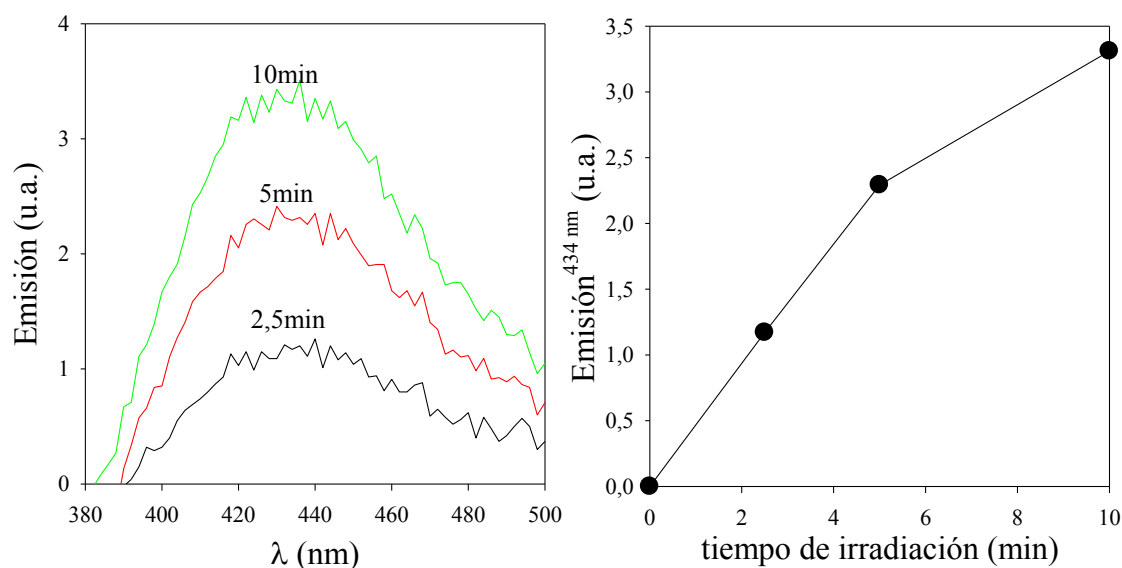


Figura 14.9. Espectros de emisión del producto P₁ aislado, de soluciones irradiadas equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación, **(b)** Seguimiento de la emisión a 434 nm; [Ptr]₀ = 48 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 50 μ M; pH = 5,5; λ_{exc} = 325 nm, λ_{em} = 435 nm.

Por otra parte, se ha reportado que la kinureninina (Kyn) es otro producto de oxidación del Trp. Este producto se genera a través de una reacción térmica a partir de la NFK. La Kyn tiene una banda de menor energía en 360 nm, y una emisión fluorescente característica con un máximo alrededor de 480 nm. Para comprobar la formación de este producto en la reacción fotosensibilizada, se midieron los cromatogramas una muestra fotolizada por HPLC-PDA/FL, donde se observara claramente la formación de NFK. Posteriormente, se dejó la solución a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se tomó nuevamente el cromatograma en las mismas condiciones utilizadas. Los resultados indican que debido a la reacción térmica, se genera un nuevo pico con t_r = 4,88 min, el cual tiene un espectro de absorción que coincide con lo reportado para la Kyn (Figura 14.10).

Para confirmar que este producto se estaba generando debido a la reacción térmica de la NFK se realizaron medidas con HPLC-FL, utilizando como condiciones de análisis la emisión de la Kyn (λ_{exc} = 360 nm, λ_{em} = 480 nm). En la Figura 14.11, se presentan los cromatogramas de fluorescencia tomados en estas condiciones, en donde se puede apreciar que solo un producto fluoresce. Para completar esta información se aisló este producto desde el HPLC-PDA, para medir el espectro de emisión. Los resultados se presentan en la Figura 14.11 (a), donde se observa que el producto aislado emite en el rango de 400 – 560 nm, con un máximo centrado en 475 nm aproximadamente. Este

resultado es una evidencia, que la reacción térmica de NFK, formado desde las soluciones irradiadas de α -MSH_{Y2G} y Ptr, lleva a la generación de Kyn.

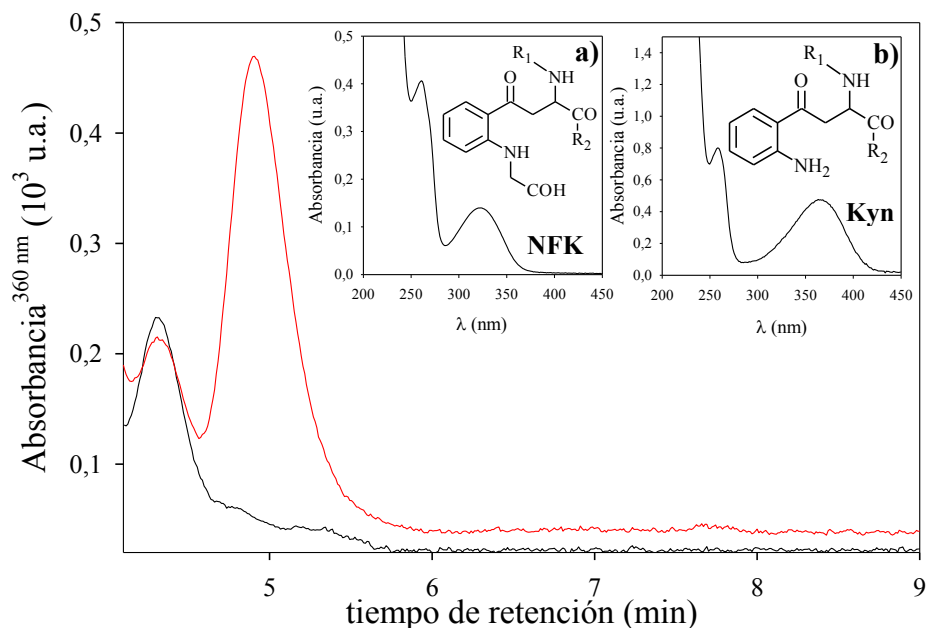


Figura 14.10. Cromatogramas registrados de una solución de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibrada con aire irradiada 6 min y luego de su reacción térmica (48hr). **(a)** Espectros de absorción de NFK y **(b)** Espectros de absorción de Kyn. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 80 \mu\text{M}$; pH = 5,5; $\lambda_{\text{ana}} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$.

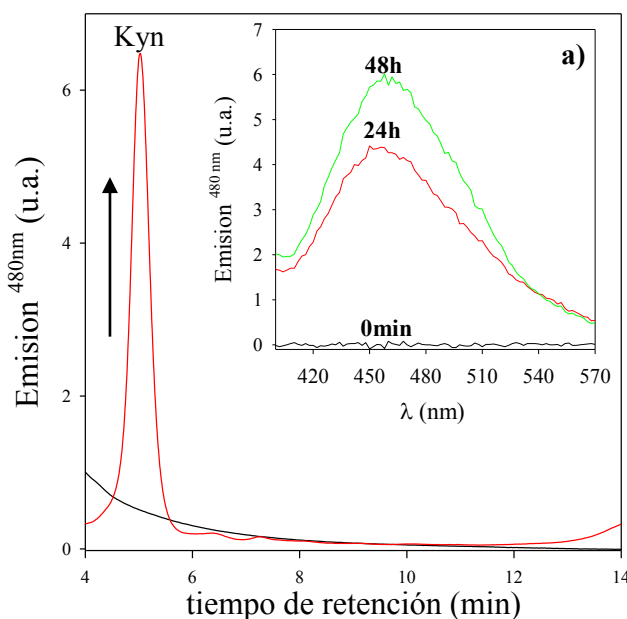


Figura 14.11. Cromatogramas registrados con HPLC-FL de soluciones irradiadas de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibradas con aire, con las condiciones de emisión de la Kyn. **(a)** Espectro de emisión registrados con el fluorómetro, del producto generado térmicamente. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 80 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$; pH = 5,5.

El 5-hidroxitriptófano (5-HTP) es otro compuesto propuesto como producto de oxidación fotosensibilizada de Trp por Ptr¹ y previamente se ha reportado que este compuesto se encuentra presente en los pacientes que sufren vitíligo³. Se realizó el análisis de los picos de menor intensidad dentro del cromatograma y se encontró que uno de estos picos, con $t_r = 4,23$ min, presenta un espectro de absorción compatible con el reportado para 5-HTP (Figura 14.12).

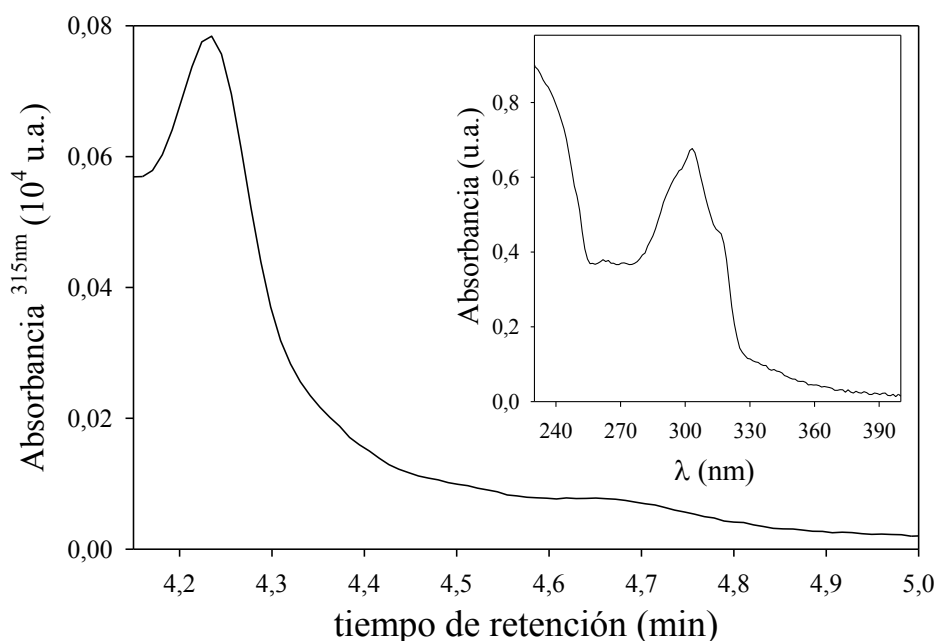


Figura 14.12. Cromatogramas registrados de una solución de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibrada con aire irradiada 6 min. Inset: Espectros de absorción del producto con $t_r = 4.23$ min. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 80 \mu\text{M}$; pH = 5,5; $\lambda_{\text{ana}} = 315$ nm; $\lambda_{\text{irr}} = 350$ nm.

Para comprobar esto, se realizaron medidas de fluorescencia con las condiciones del 5-HTP ($\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm) y los resultados demuestran que hay un pico que emite y además crece con el tiempo de irradiación y luego desciende (Figura 14.13). Este comportamiento puede deberse a la fotoquímica propia del 5-HTP, lo que conlleva a un consumo del producto después de un tiempo, indicando que es fotosensible en presencia de Ptr.

Por otra parte, este compuesto fue aislado a partir de los cromatogramas tomados por HPLC-PDA y se midió el espectro de emisión a la solución con fluorómetro (Capítulo 7). El resultado demostró que el espectro de emisión obtenido tiene un máximo en 345 nm, lo cual coincide con lo reportado para el 5-HTP (Figura 14.13(a)). Todos estos resultados fueron comparados con las propiedades espectroscópicas reportadas para el 5-HTP⁴, lo que sugiere que el producto detectado es el 5-HTP ó un isómero.

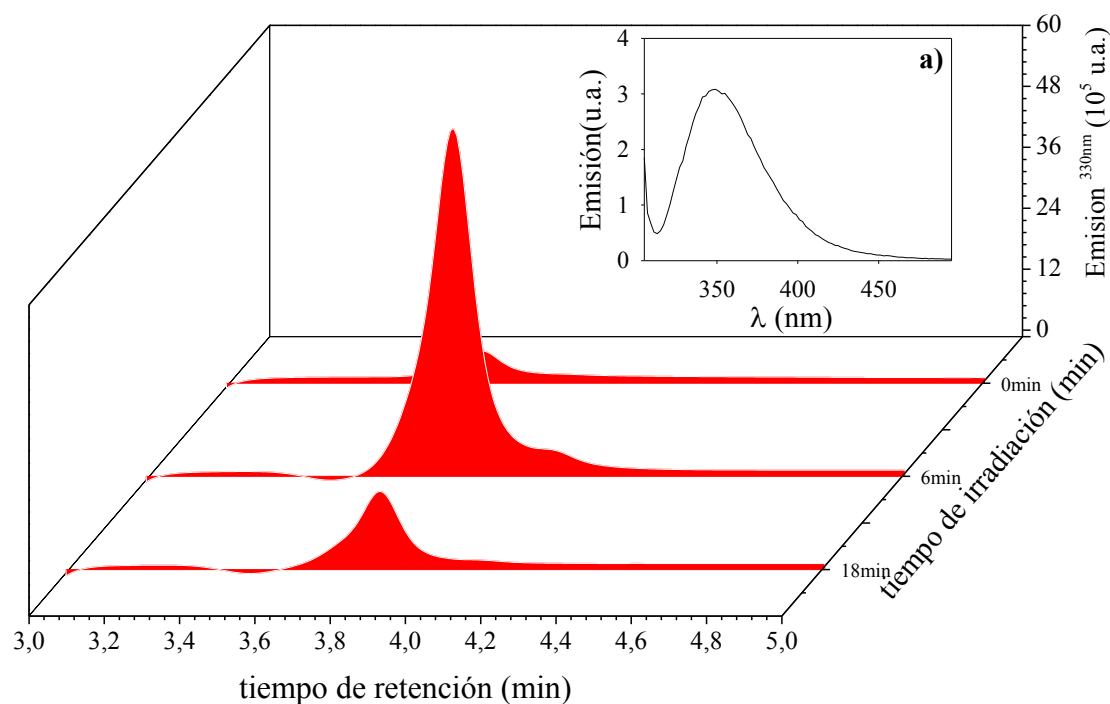


Figura 14.13 Cromatogramas de soluciones irradiadas de Ptr y α -MSH_{Y2G} equilibradas con aire. (a) Espectro de emisión del producto aislado, registrados con el fluorómetro ($\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm). [Ptr]₀ = 100 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 80 μ M; $\lambda_{\text{exc}} = 315$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm; pH = 5,5.

14.2.2 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

El estudio de los productos generados en la reacción fotosensibilizada se llevó a cabo análogamente a lo presentado en capítulos anteriores. Las soluciones que contienen α -MSH_{Y2G} y Ptr a pH 5,5 fueron analizadas por UPLC-MS acoplado a espectrometría de masas, utilizando la Columna Jupiter Proteo 90A. El análisis de masa fue llevado a cabo en modo positivo y modo negativo (ESI⁺ y ESI⁻), sin embargo se observó mejores intensidades en los picos en modo positivo.

La fórmula molecular de α -MSH_{Y2G} es C₇₀H₁₀₄N₂₁O₁₈S y su peso molecular es 1559,7295 Da. Las soluciones sin irradiar mostraron dos picos con t_r 6,76 min y 10,86 min, los cuales fueron asignados a la Ptr y α -MSH_{Y2G} respectivamente (Figura 14.14 (a)). Los cromatogramas de masas de las soluciones irradiadas mostraron la aparición de dos picos nuevos con $t_r = 9,7$ y 7,2 min, denominados P₁' y P₂' respectivamente (Figura 14.14 (b)). Es importante aclarar que las condiciones de medida para estos experimentos fueron diferentes a las realizadas por HPLC (Sección 14.1.1), debido a esto los t_r difieren, pero el orden de salida de cada compuesto coincide.

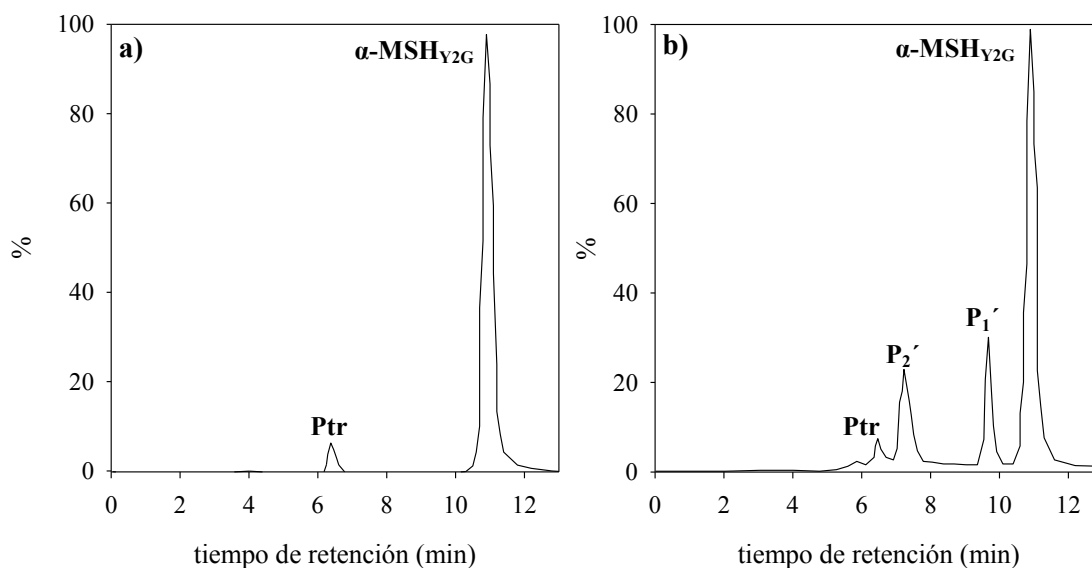


Figura 14.14. Cromatogramas de masas registrados de soluciones que contenían α -MSH_{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) 0 min. (b) 6 min. $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu\text{M}$; pH= 5,5.

En la Figura 14.15 se presentan el espectro de masa en modo ESI⁺ de pico correspondiente a α -MSH_{Y2G}. En este caso se identificó un ión molecular tanto en su forma monocargada (m/z 1559,75 Da) como dicargada (m/z 780,3794 Da), observando mejor intensidad en este último modo. Por otra parte, también se detectó el ion molecular de la Ptr ($[\text{M} + \text{H}]^+ = [\text{Ptr} + \text{H}]^+$) a m/z 164,0566 Da con $t_r = 6,76$ min.

El espectro de masas correspondiente a P₁' mostró la formación de los iones moleculares a m/z 788,3760 Da y 796,3698 Da, que corresponden a la incorporación de uno y dos átomos de oxígeno a α -MSH_{Y2G} (Figura 14.16). Como se puede observar en los espectros de masas, estas m/z muestran un conjunto de picos, los cuales tienen una separación de 0,5 Da, indicando que la mejor detección para estos fue en modo dicargado. Los cromatogramas obtenidos a m/z 788,3760 Da y 796,3698 Da, mostraron la formación de un solo pico para cada m/z , con $t_r = 9,67$ min y $t_r = 9,66$ min, respectivamente (Figura 14.16 (a) y (b)). Los perfiles de las áreas integradas para cada producto en función del tiempo de irradiación, indicaron que los mismos crece en el tiempo (Figura 14.16 (c)). Es importante aclarar que en el cromatograma de absorbancia aunque se observe un solo pico para P₁', se identificó la formación de dos productos para este pico con t_r muy cercanos.

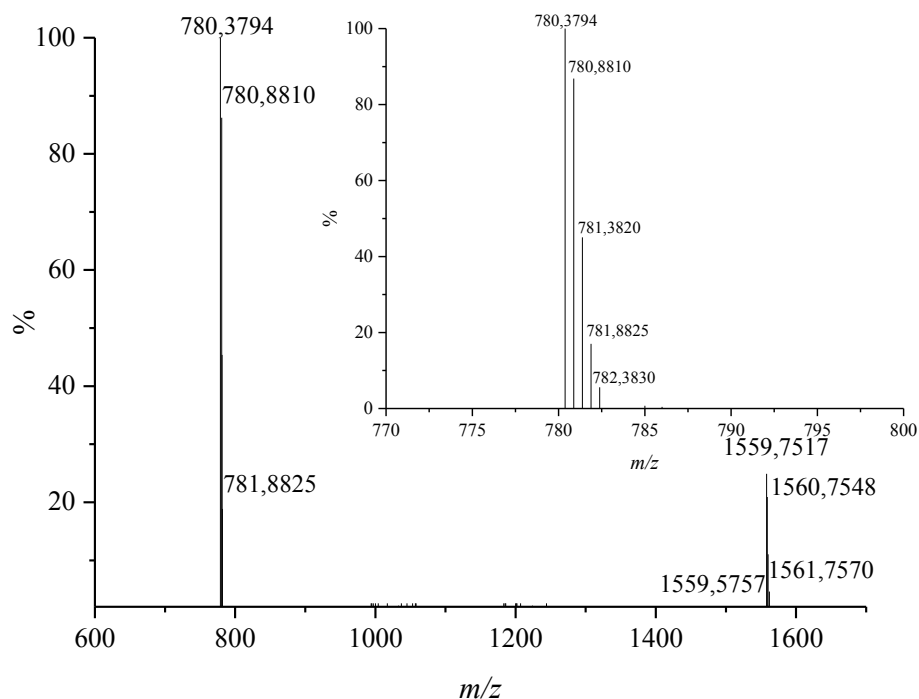


Figura 14.15. Espectros de masa del pico con t_r 10.8 min correspondientes a α -MSH_{Y2G}, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar; [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 350 μ M; pH 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

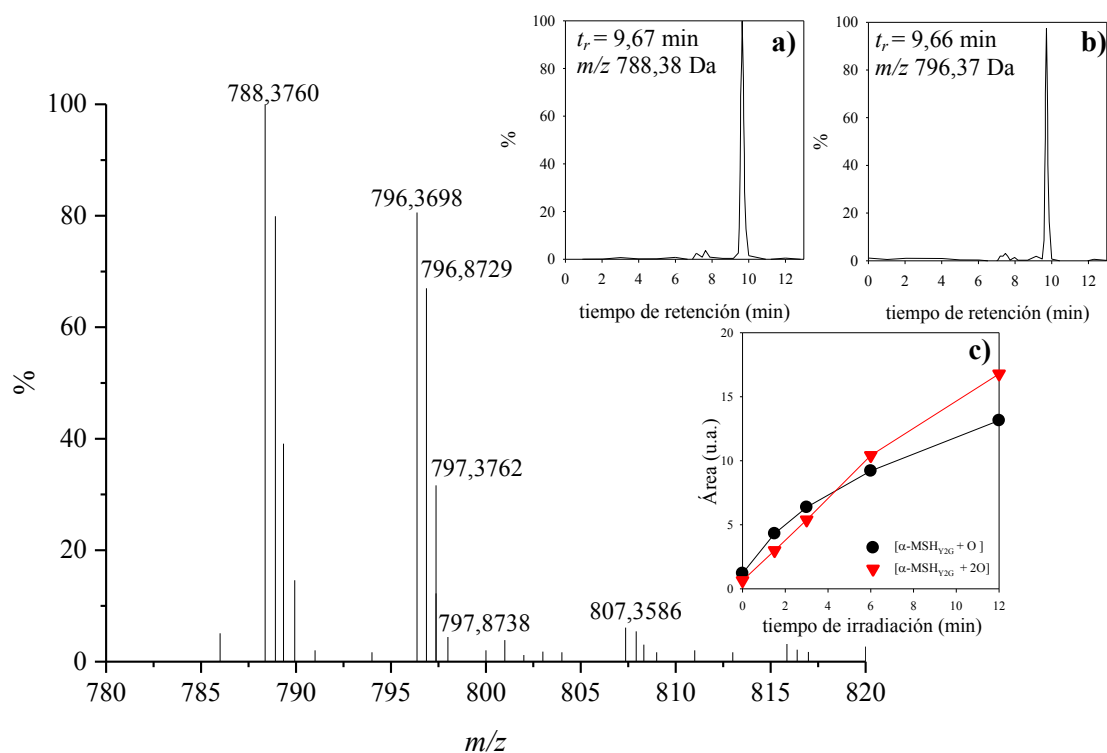


Figura 14.16. Espectros de masas de P_1' de soluciones irradiadas de α -MSH_{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) Cromatograma de masas a m/z = 788,38 Da. (b) Cromatograma de masas a m/z = 796,37 Da. (c) Evolución de los productos en función del tiempo de irradiación. [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 350 μ M; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Por otra parte, se identificó una m/z a 804,3690 Da para P_2' , que corresponde a la incorporación de tres átomos de oxígeno al péptido (Figura 14,17). El cromatograma de masa a m/z fijo, mostró la formación de un solo producto que crece en función del tiempo de irradiación (Figura 14,17 (a) y (b)).

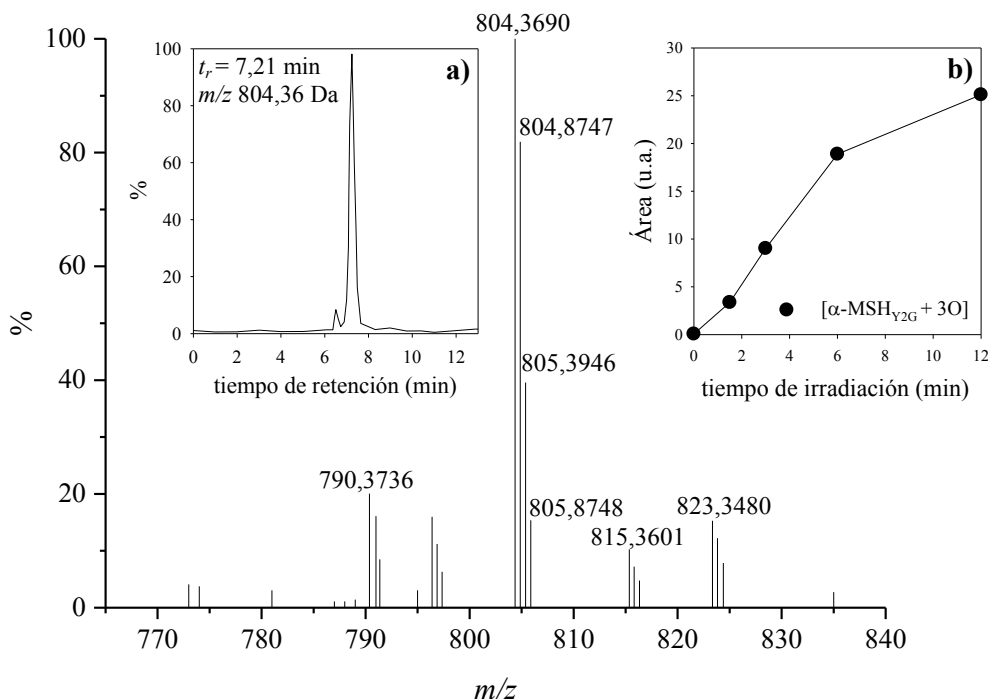


Figura 14.17. Espectros de masas de P_2' de soluciones irradiadas de α -MSH_{Y2G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. **(a)** Cromatograma de masas a $m/z = 804,36$ Da. **(c)** Evolución del producto en función del tiempo de irradiación; $[Ptr]_0 = 50 \mu M$ y $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 350 \mu M$; pH= 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Se observó que la formación de productos diméricos, no ocurre en este péptido, confirmando que la dimerización obtenida para la α -MSH (Capítulo 13), es precisamente por la presencia residuo de Tyr lo que lleva a la formación de Tyr₂. Estos resultados indican que bajo irradiación UV-A y en presencia de Ptr, la α -MSH_{Y2G} sufre fotooxidación. Además, se generan diferentes productos que corresponden a las incorporaciones de hasta 3 átomos de oxígenos. Con este resultado podemos relacionar los productos que se observaron por HPLC-PDA/FL, y se podría decir en principio que los productos generados por la reacción fotosensibilizada de α -MSH_{Y2G} por Ptr, son NFK y 5-HTP, los cuales están reportados en literatura para la oxidación del Trp. Por otra parte las otras incorporaciones que fueron observadas se pueden adjudicar a la presencia de otros residuos de aminoácidos también oxidables, tales como la metionina y la histidina.

14.3 Determinación del mecanismo de reacción

La evaluación del mecanismo se realizó de manera análoga a lo presentado en los capítulos anteriores y los resultados serán comparados con los datos reportados para Trp libre. Se prestó mayor interés en esclarecer el mecanismo que conlleva a la formación de los productos mencionados anteriormente.

14.3.1 Rol del Oxígeno

Los resultados presentados en la Figura 14.18, muestran el efecto inhibitorio en el consumo de α -MSH_{Y2G} cuando las soluciones son saturadas con O_2 . Este comportamiento se puede explicar si se tiene en cuenta la capacidad del O_2 en estado fundamental para desactivar eficientemente los estados excitados tripletes de las pterinas⁵ sin desactivar los estados excitados singlete. Con toda la información, se puede pensar que los estados tripletes de la Ptr ($^3Ptr^*$) están involucrados en el proceso de oxidación del péptido y son precursores del proceso fotosensibilizado. La generación de los productos también fue evaluada en condiciones de saturación de O_2 , donde se observó el mismo efecto inhibitorio. Por otra parte, los perfiles de las soluciones burbujeadas con Ar, no mostraron consumo del péptido, ni formación de los productos, indicando que la reacción fotosensibilizada se da en presencia de O_2 .

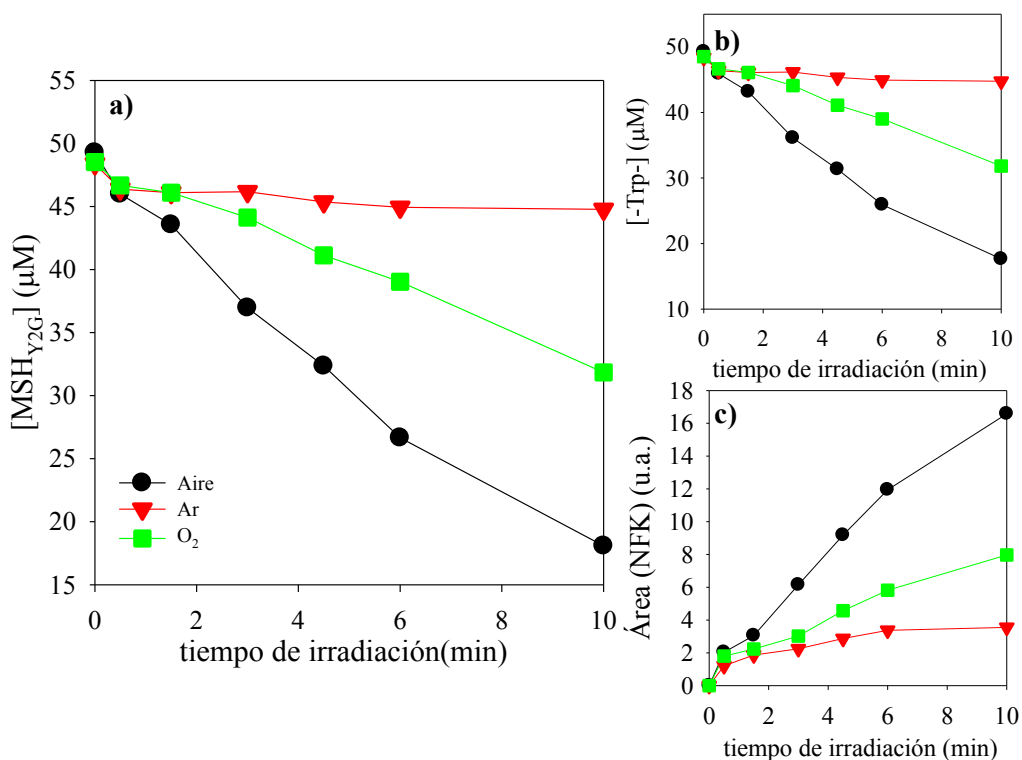


Figura 14.18. Evolución de las concentración de soluciones acuosas equilibras con Aire y saturadas con Ar y O₂ en función del tiempo de irradiación. **(a)** α-MSH_{Y2G}, **(b)** Residuo de Trp ($\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 355$ nm). **(c)** Formación de NFK ($\lambda_{exc} = 325$ nm, $\lambda_{em} = 435$ nm). $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50$ μM; $[\text{Ptr}]_0 = 50$ μM; pH 5,5; pH 5,5; l = 1cm.

14.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

En la Figura 14.19 se puede observar el efecto que tiene la presencia de KI sobre la oxidación del péptido, utilizando Ptr como sensibilizador. La inhibición en el consumo de α-MSH_{Y2G} en presencia de KI, comparado con el consumo en ausencia de dicho compuesto, se puede adjudicar a la desactivación de los estados tripletes del fotosensibilizador. Este resultado es muy similar a lo observado por el detector de fluorescencia, tanto para el residuo de Trp como para la formación de NFK, indicando que la generación de estos productos puede iniciar desde el estado triplete.

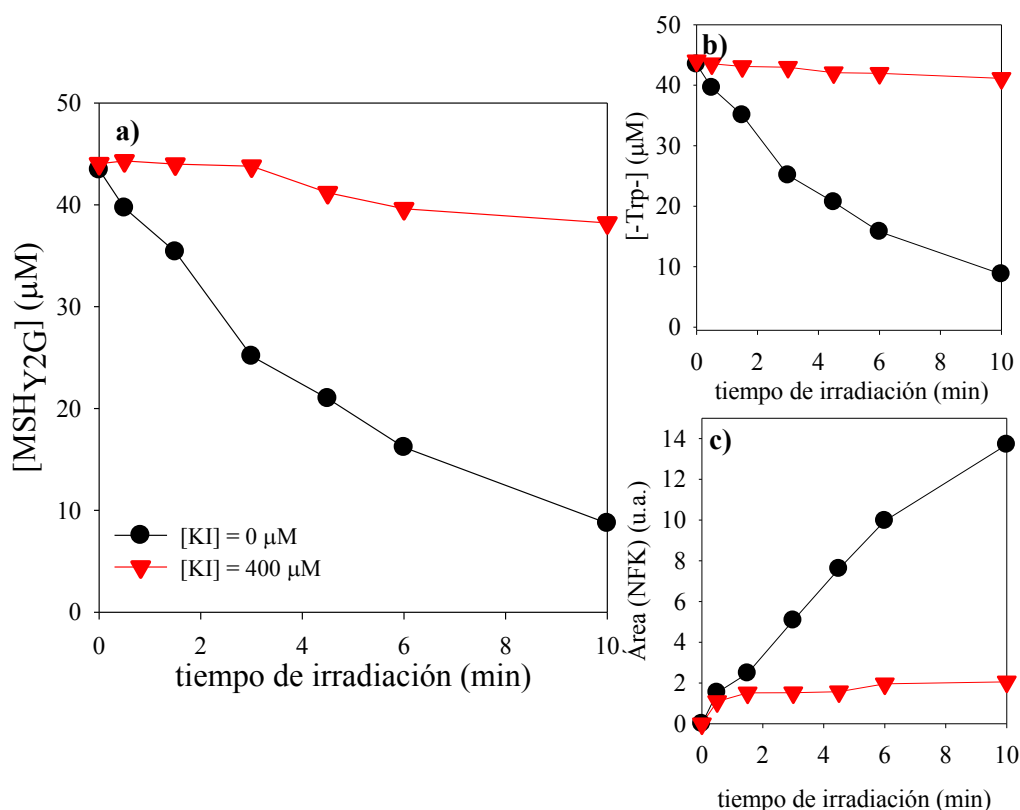


Figura 14.19. Evolución de la concentración de soluciones acuosas equilibradas con Aire en presencia y ausencia de KI en función del tiempo de irradiación. (a) α -MSH_{Y2G}. (b) Residuo de Trp ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$). (c) Formación de NFK ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$). [α -MSH_{Y2G}]₀ = 45 μM ; [Ptr]₀ = 50 μM ; [KI] = 400 μM ; pH 5,5; l = 1 cm.

14.3.3 Contribución de la oxidación por $^1\text{O}_2$

Para mirar el efecto que tiene el oxígeno singlete en esta reacción, se realizaron fotólisis comparativas en H_2O y D_2O . Se debe tener en cuenta que el tiempo de vida media (τ_Δ) de esta especie reactiva del oxígeno es mayor en agua D_2O ⁶, lo que conlleva a que la concentración de $^1\text{O}_2$ en estado estacionario sea mayor también y la reacción entre α -MSH_{Y2G} y $^1\text{O}_2$ ocurra en mayor proporción, siempre y cuando esta sea una vía prioritaria. Se realizaron fotólisis de soluciones aireadas entre Ptr y α -MSH_{Y2G} en H_2O / D_2O , se siguió el consumo del péptido por HPLC-PDA/FL y se compara las velocidades iniciales de consumo, teniendo en cuenta que la concentración inicial de ambos reactivos sea similar.

Como se puede observar en la Figura 14.20, la velocidad inicial de consumo de α -MSH_{Y2G} obtenida en H_2O y D_2O fue de orden muy cercano, indicando que el $^1\text{O}_2$ no participa prioritariamente en el mecanismo de reacción. Por otra parte, se observó que la

formación de NFK fue mayor en D₂O que en H₂O (Figura 14.20 (c)), lo que podría ser lógico ya que la NFK es un producto típico de la oxidación del Trp por ¹O₂⁷. Sin embargo, el aumento en la velocidad de producción de NFK no es tan grande como se hubiera esperado para los tiempos de vida del ¹O₂ en ambos solventes. Por lo tanto, se podría sugerir que la NFK podría formarse por un mecanismo tipo I. Además aunque el aumento de la formación de NFK fue significativo en D₂O y H₂O, el aumento en la velocidad de consumo de MSH_{Y2G} no lo fue.

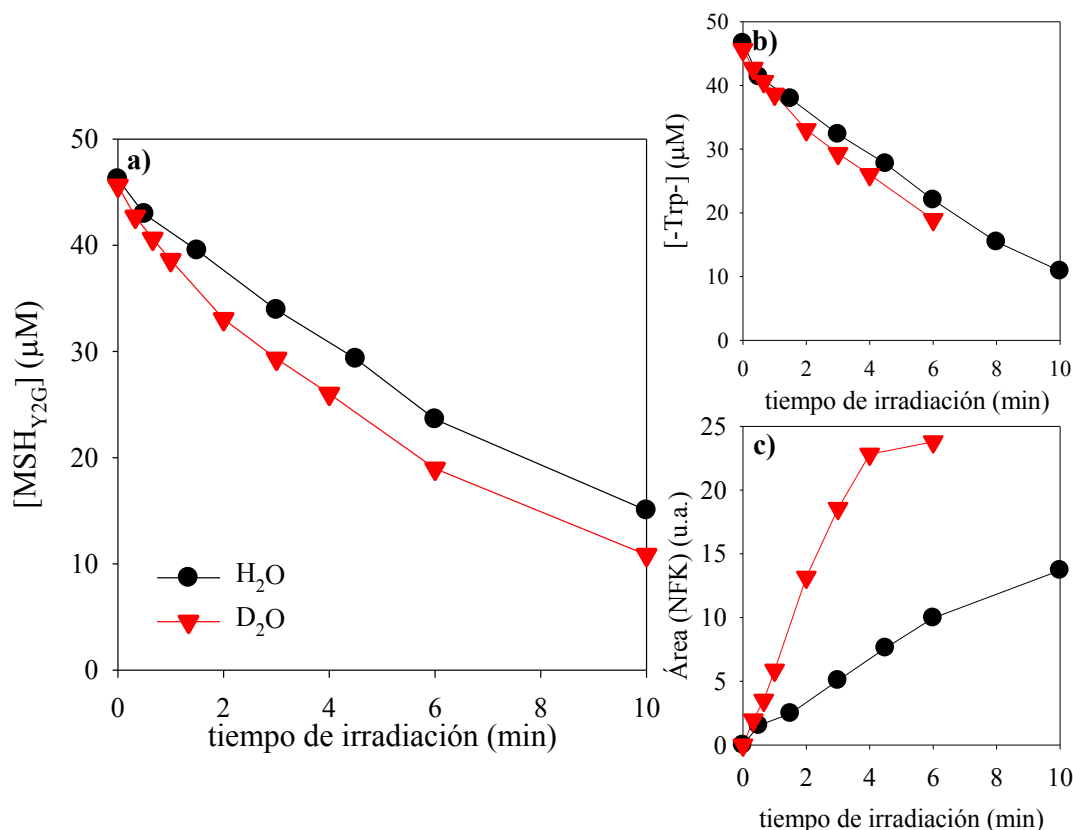


Figura 14.20. Evolución de la concentración de soluciones acuosas equilibradas con Aire en D₂O/H₂O en función del tiempo de irradiación. **(a)** α-MSH_{Y2G}. **(b)** Residuo de Trp ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$). **(c)** Formación de NFK ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$). $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 45 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 50 \text{ } \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

Teniendo en cuenta que la reacción fotosensibilizada entre Ptr y α-MSH_{Y2G}, ocurre principalmente sobre el residuo de Trp, se puede estimar la reacción entre (-Trp-) y el ¹O₂. El valor reportado de la constante química de reacción entre en el ¹O₂ y el Trp ($k_r = 1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la contribución de ¹O₂ para la reacción fotosensibilizada de (-Trp-) por Ptr se puede evaluar, comparando la velocidad inicial de consumo de (-Trp-) y la velocidad calculada de la reacción entre (-Trp-) y ¹O₂.

$$\left(\frac{\partial[(-Trp-)]}{\partial t} \right)_{0,calc} = k_r[(-Trp-)][^1O_2] \quad (14.1)$$

La concentración en estado estacionario de 1O_2 durante el tiempo que se irradia la solución que contiene Ptr y α -MSH_{Y2G}, se puede calcular como se explicó en el Capítulo 1 y los resultados se presentan en la Tabla 14.1.

Con estos resultados podemos concluir que el consumo debido a la oxidación por 1O_2 es más lento que la velocidad experimental, confirmando que el mecanismo tipo II no juega un papel primordial y no es el mecanismo dominante en la oxidación de α -MSH_{Y2G} y por lo tanto de (-Trp-).

Tabla 14.1. Velocidades iniciales de consumo de α -MSH_{Y2G} experimental y calculada para la reacción de 1O_2 y α -MSH_{Y2G}

	Experimental (μ M/ min)	Calculada* (μ M/ min)
H₂O	3,67 \pm 0,12	0,14
D₂O	6,12 \pm 0,32	2,1

*Este valor fue calculado para la reacción con 1O_2

14.3.4 Irradiación en presencia de SOD

Como se ha reportado anteriormente la Ptr es un buen sensibilizador de oxígeno singulete (1O_2), sin embargo como ya se pudo observar la oxidación de α -MSH_{Y2G} es principalmente sobre el residuo de triptófano, y la reactividad reportada de este aminoácido es relativamente baja frente a esta especie reactiva del oxígeno. Debido a esto se puede sospechar que el proceso fotosensibilizado está llevándose a cabo a través de un mecanismo tipo I. Para comprobar que el mecanismo tipo I está involucrado en la reacción se realizaron medidas del consumo de sustrato en presencia y en ausencia de superóxido dismutasa (SOD). Como se puede observar en la Figura 14.21 hay un aumento en la velocidad de consumo de α -MSH_{Y2G} en presencia de SOD. Este resultado sugiere en principio que el $O_2^{\bullet-}$ está participando en la reacción, porque no se observa una inhibición del sustrato, sino por el contrario un aumento en el consumo del mismo. Esto se puede explicar con mayor claridad, porque al eliminar el $O_2^{\bullet-}$ del medio se está suprimiendo una vía de recuperación del péptido.

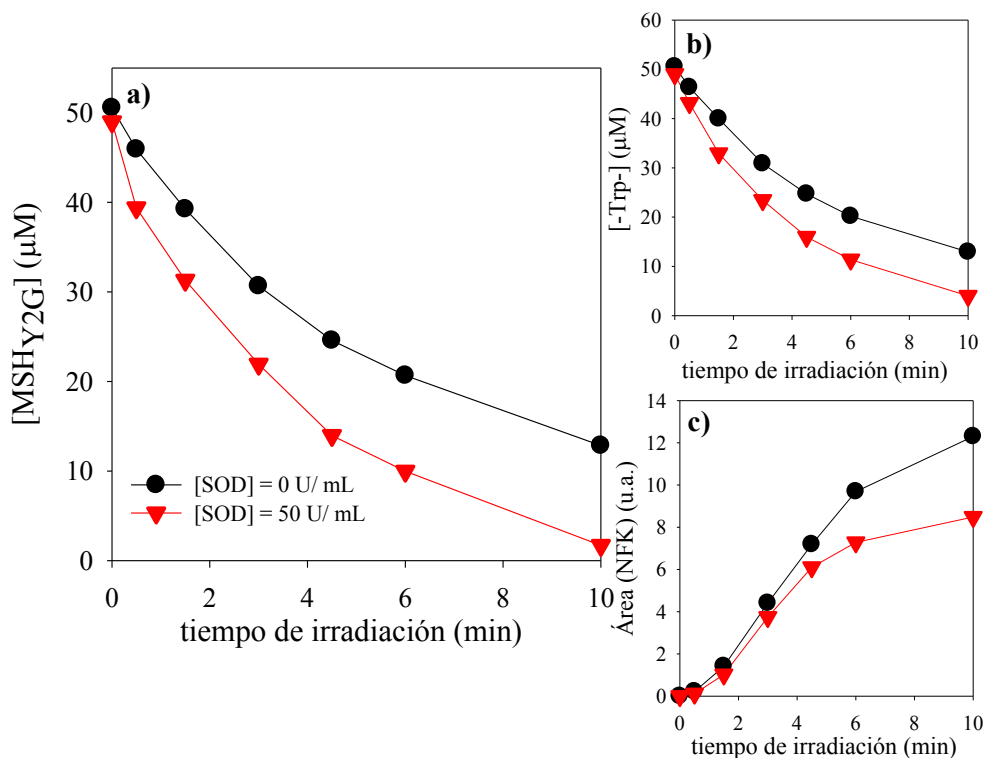


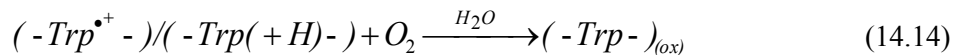
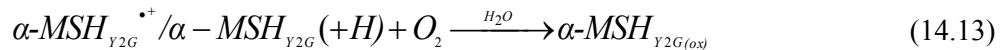
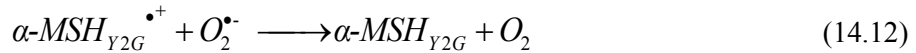
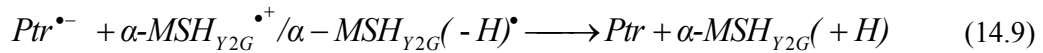
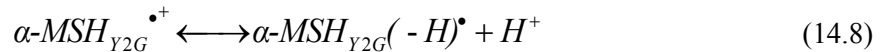
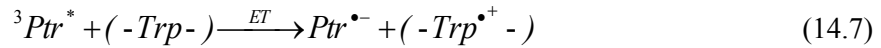
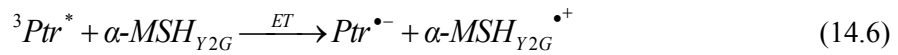
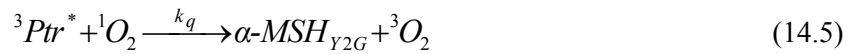
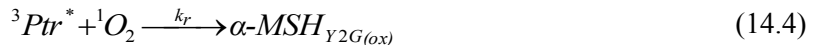
Figura 14.21. Evolución de la concentración de soluciones acuosas equilibradas con Aire en presencia y ausencia de SOD en función del tiempo de irradiación (a) $\alpha\text{-MSH}_{Y2G}$. (b) Residuo de Trp ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 355 \text{ nm}$). (c) Formación de NFK ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 435 \text{ nm}$). $[\alpha\text{-MSH}_{Y2G}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\text{SOD}] = 50 \text{ U/mL}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

14.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

Después de la excitación de la Ptr y la formación del estado triplete del fotosensibilizador, $^3\text{Ptr}^*$ (Reacciones (14.1) y (14.2)), se pueden generar varios caminos de desactivación de este estado excitado. El primero es que la Ptr vuelva a su estado fundamental por cruce entre sistemas (Reacción (14.3)); El segundo es por transferencia de energía al oxígeno molecular, lo que lleva a la Ptr a volver al estado fundamental y a la formación de $^1\text{O}_2$ (Reacción 14.4); Y el tercero es una transferencia de electrones (ET) desde el estado fundamental del péptido, más específicamente el residuo del Trp, al $^3\text{Ptr}^*$ para formar el radical catión $\text{MSH}_{Y2G}^{\bullet+}/\text{Trp}^{\bullet+}$ y el radical anión de la Ptr ($\text{Ptr}^{\bullet-}$) (Reacción 14.6).

Por otro lado, la transferencia de electrones de $\text{Ptr}^{\bullet-}$ al O_2 conlleva a la regeneración de la Ptr y a la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacción 14.10). El radical puede tomar dos caminos, el primero dismutar con su ácido conjugado y llevar a la formación de H_2O_2 (Reacción

14.11) y el segundo es una transferencia de electrones con $MSH_{Y2G}^{\bullet+}$ para regenerarlo a MSH_{Y2G} (Reacción 14.12). Finalmente, un grupo de reacciones de procesos que se resumen en la Reacción 14.13, muestran la oxidación a la que puede ser llevado el péptido en presencia de O_2 y H_2O .



En los experimentos realizados en soluciones aireadas, podemos relacionar la velocidad de consumo del sustrato con la Reacción 14.7. Por otra parte, en soluciones saturadas con oxígeno, la Reacción 14.3 compite eficientemente con la Reacción 14.6, es decir, la cantidad de ${}^3Ptr^*$ que reaccionan con $\alpha\text{-}MSH_{Y2G}$ es menor y por lo tanto el consumo del péptido es mucho menor (Figura 14.18). La inhibición en el consumo del péptido en ausencia de oxígeno puede explicarse con la Reacción 14.14 en la cual el ion radical puede recombinar y volver al estado fundamental tanto el fotosensibilizador como la MSH_{Y2G} .

14.4 Conclusiones

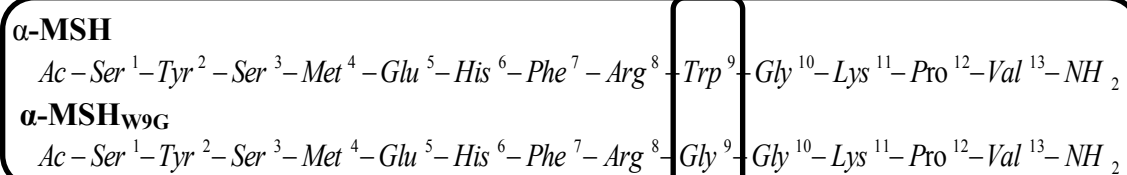
Se ha demostrado que en la reacción fotosensibilizada de soluciones que contienen Ptr y α -MSH_{Y2G} a pH 5,5, conlleva al consumo del péptido, mientras que el fotosensibilizador no se consume. Se plantea un mecanismo de reacción tipo I, iniciado por una transferencia de electrones desde el estado triplete del fotosensibilizador al estado fundamental del sustrato, lo que lleva a la formación del par radical ($Ptr^{\bullet-}$ y α -MSH_{Y2G}^{•+}). En este punto, el radical formado por la Ptr reacciona con el O₂ presente en el medio y lleva a la formación del O₂^{•-}, regenerando el fotosensibilizador. Por otra parte el radical α -MSH_{Y2G}^{•+} reacciona con O₂^{•-} para recombinarse y volver al estado fundamental (α -MSH_{Y2G} y O₂). En la misma reacción se observó la generación de H₂O₂ formado por la dismutación del O₂^{•-}. Por otra parte, el ¹O₂ no es una especie predominante en esta reacción. La identificación de fotoproductos demostró que debido a la reacción fotosensibilizada se generaron al menos tres productos de oxidación del Trp, los cuales son N-formil-quinurenina (NFK), la cual por una reacción térmica lleva a Kinurenina (Kyn) y 5-hidroxitriptofano (5-HTP).

Bibliografía

1. Thomas, A. H. *et al.* ; *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 467–475 (2013).
2. Yasutsugn, F.; Yasuhiro, K.; Takashi, I. . F. S. ; *J. Biochem.* **92**, 129–141 (1982).
3. Schallreuter, K. U.; Salem, M. A.; Gibbons, N. C.; Martinez, A.; Slominski, R. ; *FASEB J.* **26**, 2457–2470 (2012).
4. Lakowicz, J. R. . *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; (2006).
5. Denofrio, M. P., Ogilby, P. R., Thomas, H. & Lorente, C. ; *Photobiol. Sci.* **13**, 1058–1065 (2014).
6. Wilkinson, F.; Helman, H. P.; and Ross, A. B. . ; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 663–677 (1995).
7. Ronsein, G. E.; Oliveira, M. C. B.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. ; *Chem. Res. Toxicol.*; **21**, 1271–1283 (2008).

Capítulo 15: Degradación fotosensibilizada de tirosina en entorno peptídico

En capítulos anteriores, se demostró que la Ptr es capaz de oxidar los residuos de Trp y Tyr en una cadena peptídica y además es capaz de llevar a la generación de diferentes productos debido a la oxidación del residuo del aminoácido a través de un mecanismo tipo I (Capítulo 13). En el capítulo anterior, se realizó el estudio de las reacciones sufridas por el péptido α -MSH_{Y2G} mutando el residuo de la Tyr, en donde se demostró que al menos el residuo de Trp es oxidado y además que en este caso no existe generación de dímeros. En este capítulo se investigó el residuo de tirosina (-Tyr-), para esto se mutó en la secuencia de α -MSH, el residuo de Trp en la posición 9 por Gly (aminoácido no susceptible a la oxidación). Este péptido fue denominado α -MSH_{W9G}, y sobre el mismo se realizaron estudios de oxidación específicamente del residuo de Tyr, la generación de fotoproductos y la formación de dímeros de tirosina (Tyr₂).



15.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar α -MSH_{W9G}

Las soluciones que contenían Ptr y α -MSH_{W9G} fueron expuestas a radiación UV-A (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*) por diferentes periodos de tiempo. Posteriormente se analizaron por espectroscopia *UV-Visible*, *HPLC-PDA/FL*, *fluorescencia* y *ULPC-MS*.

En la Figura 15.1 se presenta el espectro de absorción de α -MSH_{W9G}, en el cual predomina la absorción del residuo de Tyr. Por otra parte, se observó que, como se ha demostrado anteriormente, este compuesto no absorbe en la región UV-A.

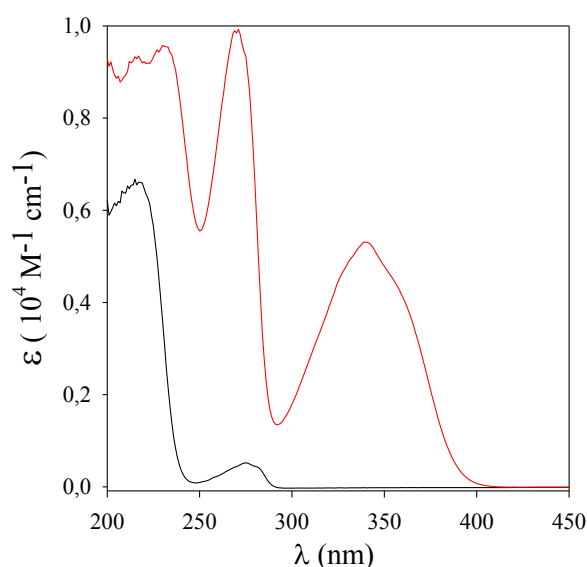


Figura 15.1. Espectros de absorción de α -MSH_{w9G} y Ptr de soluciones acuosas equilibradas con aire a pH=5,5.

15.1.1 Análisis espectroscópico

Los cambios espectrales de las soluciones irradiadas de α -MSH_{w9G} y Ptr a pH 5,5, se presentan en la Figura 15.2, en donde se aprecia un aumento en la absorbancia en todo el rango del espectro, lo cual es compatible con lo obtenido para Tyr libre (Capítulo 9). Este resultado demuestra que existe un cambio químico en la solución debido a la reacción fotosensibilizada.

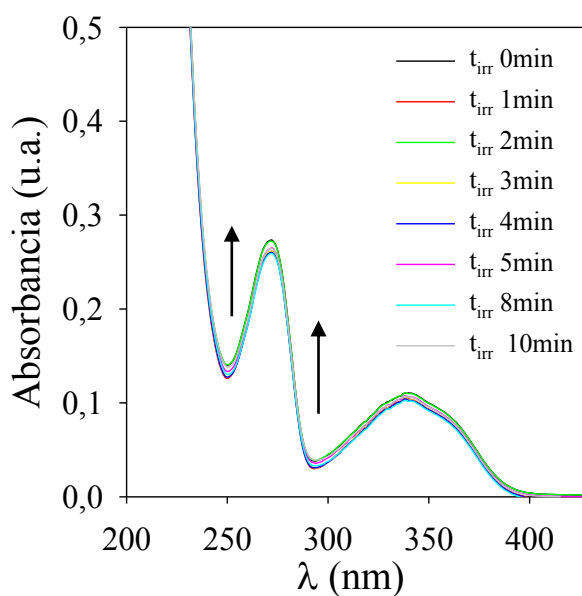


Figura 15.2. Evolución de los espectros de absorción de soluciones de α -MSH_{w9G} y Ptr acuosas aireadas. [Ptr]₀ = 20 μ M; [α -MSH_{w9G}]₀ = 40 μ M; pH 5,5; λ_{irr} = 350 nm; l = 1 cm.

15.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Después de la irradiación las muestras fueron analizadas por HPLC con los detectores PDA y FL. Las corridas se realizaron utilizando la Fase Móvil IV y la columna Júpiter Proteo 90A (Capítulo 7). En este caso además de determinar el efecto que se tenía sobre el residuo de Tyr, el interés principal era saber si debido a la irradiación se generaban dímeros de Tyr (Tyr_2), tal y como se observó con la Tyr libre (Capítulo 9).

Los cromatogramas, obtenidos a 275 nm, se presentan en la Figura 15.3, en donde se puede observar en el tiempo cero de irradiación un pico con $t_r = 3,15$ min, el cual corresponde al péptido intacto, α -MSH_{W9G}. El pico correspondiente a la Ptr, no se presenta en esta figura, ya que sale con el frente del solvente. A pesar de esto, se realizaron controles para determinar el comportamiento del fotosensibilizador durante las irradiaciones, y no se observaron cambios apreciables del mismo.

Los cromatogramas de las soluciones irradiadas, mostraron, además de la disminución del pico de α -MSH_{W9G}, la formación de varios productos con $t_r = 2,51$ min y 4,02 min, denominados P_1 y P_2 respectivamente.

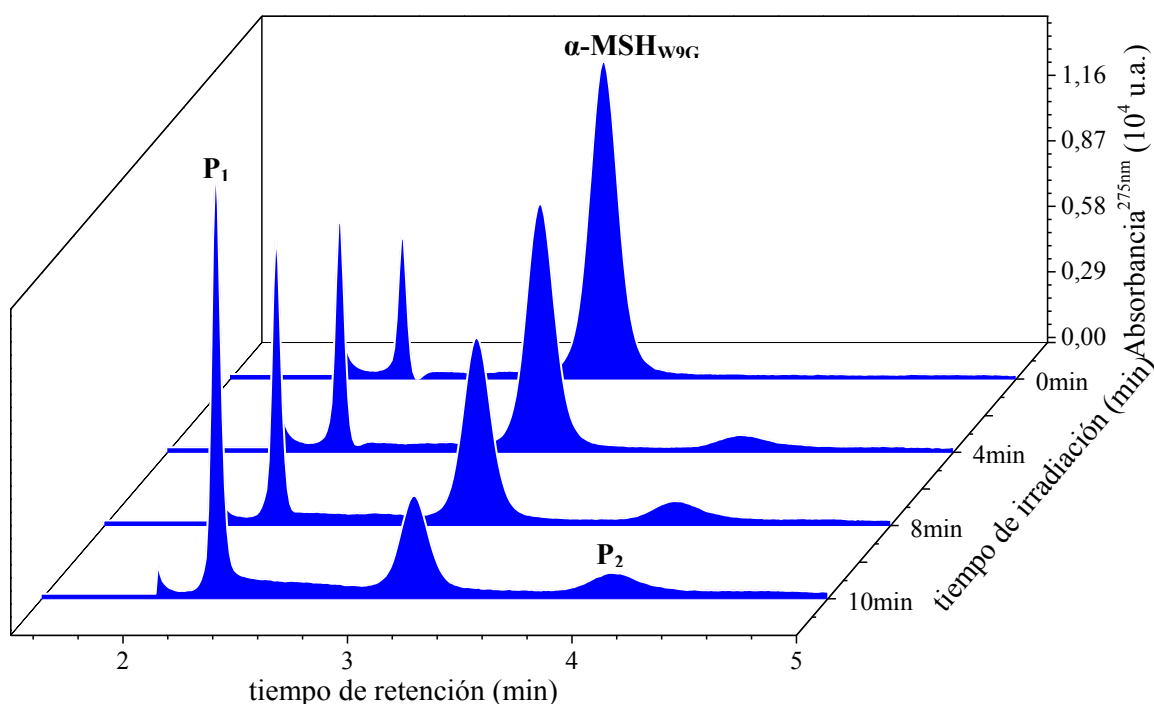


Figura 15.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH_{W9G} aireadas. $[Ptr]_0 = 50 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 46 \mu M$; pH = 5,5; $\lambda_{ana} = 275$ nm; $\lambda_{irr} = 350$ nm.

Los perfiles de concentración del péptido y la Ptr se presentan en la Figura 15.4 (a), en donde se aprecia el decaimiento en la concentración de α -MSH_{W9G} en función del tiempo de irradiación, mientras la concentración de la Ptr permanece constante. Es importante aclarar que el pico del péptido se mantuvo puro en todo el análisis, confirmando así que al menos no se generan productos en el mismo t_r y además se puede asumir que el consumo observado en la Figura 15.4 es solo de la α -MSH_{W9G}, además se observó la generación de H_2O_2 , como se puede ver en la Figura 15.4. También se presenta el perfil de los productos generados, P₁ y P₂, los cuales se analizarán con mayor detenimiento en la sección de análisis de fotoproductos (Figura 14.4 (b)).

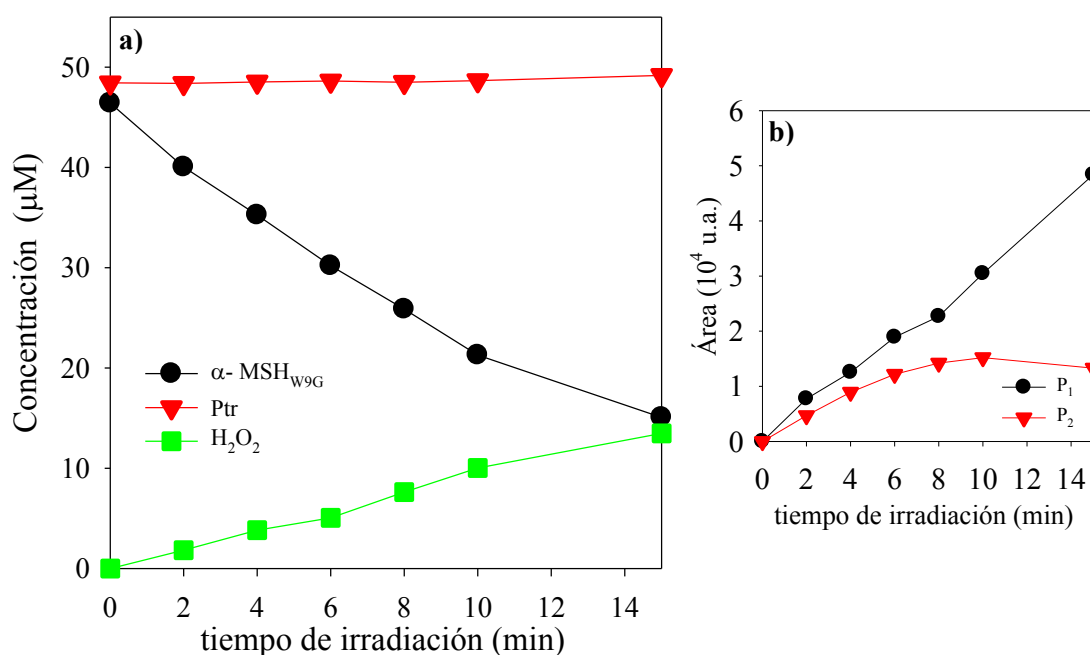


Figura 15.4. (a) Evolución de la concentración de α -MSH_{W9G}, Ptr y H_2O_2 de soluciones acuosas equilibradas con aire bajo irradiación como una función del tiempo de irradiación. **(b)** Formación de P₁ y P₂. [Ptr]₀ = 50 μM; [α -MSH_{W9G}]₀ = 46 μM; $\lambda_{\text{ana}}(\text{MSH}_{2G})$ = 275 nm; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Ptr})$ = 340 nm; λ_{irr} = 350 nm; pH = 5,5.

Por otro lado, se utilizó las características fluorescencia del cromóforo del residuo de la Tyr para observar el comportamiento del mismo en el péptido. La Figura 15.5 (a) presenta el espectro de emisión de la α -MSH_{W9G}, tomado con el equipo de fluorescencia (Capítulo 7), en donde se observa un máximo de emisión en 305 nm cuando se excita a 275 nm, lo cual coincide con lo reportado para la Tyr. Con estos resultados, se midieron los cromatogramas de fluorescencia con HPLC-FL de las soluciones irradiadas, utilizando las condiciones de emisión mencionadas anteriormente. Los resultados se presentan en la Figura 15.5, donde puede observar que el pico con t_r = 3,23 min, el cual

corresponde al residuo de Tyr y el cual disminuye en función del tiempo de irradiación, confirmando que el descenso observado por HPLC-PDA anteriormente, se da al menos sobre el residuo de Tyr.

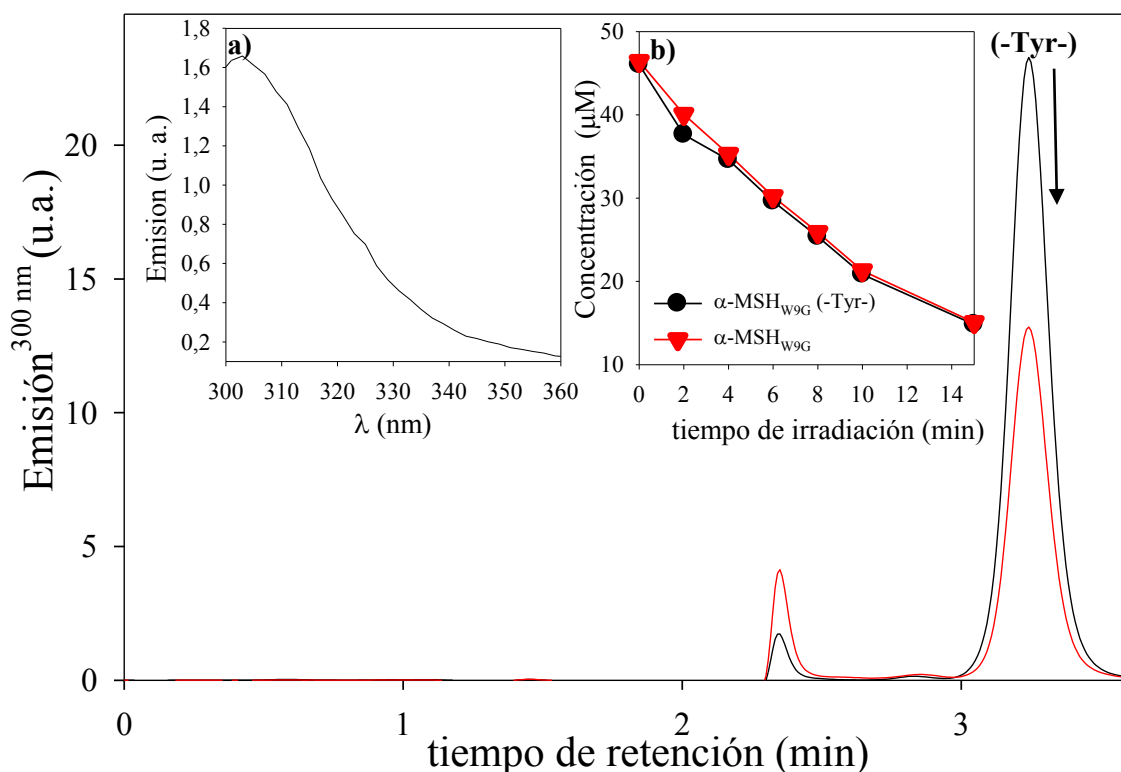


Figura 15.5. Cromatogramas de fluorescencia de soluciones de Ptr y α -MSH_{W9G} equilibradas con aire a distintos tiempos de irradiación. **(a)** Espectro de emisión del residuo de Tyr. **(b)** Evolución de la concentración del residuo de Tyr y α -MSH_{W9G}. $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 46 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300 - 360 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $\text{pH} = 5,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

15.1.3 Controles

Los controles se llevaron a cabo de igual manera a lo mencionado en capítulos anteriores, analizando las muestras por espectrofotometría y HPLC-PDA. Los resultados demostraron que no existe ningún cambio en el péptido cuando es irradiado en las mismas condiciones de trabajo pero en ausencia del fotosensibilizador. Por otra parte, no se observó reacción térmica con la Ptr.

15.2 Análisis de fotoproductos

15.2.1 Cromatografía líquida (HPLC) y análisis de productos aislados

Los análisis con HPLC-PDA, mostraron la generación de al menos dos productos que por el momento fueron denominados P_1 y P_2 (Figura 15.6). El producto P_2 tiene un espectro similar al reportado para la Tyr_2 y el t_r es mayor con respecto al péptido intacto (4,02 min).

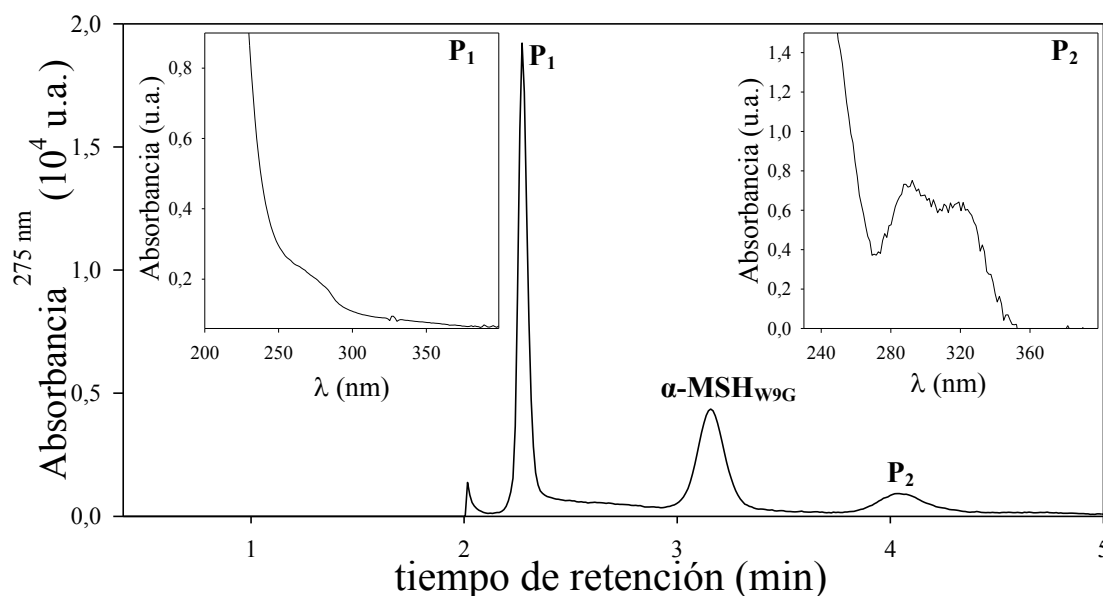


Figura 15.6. Segmento de un cromatograma de una solución irradiada durante 10 min, donde se generan los productos más representativos de la reacción. Insets: Espectros de absorción de P_1 y P_2 . $[Ptr]_0 = 50 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 46 \mu M$; $\lambda_{ana} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $pH = 5,5$.

La Tyr_2 tiene una emisión características, obtenida excitando en la banda de baja energía, resulta en una banda fluorescente centrada alrededor de 405 nm^3 . Para obtener evidencia sobre la formación de Tyr_2 en la reacción fotosensibilizada de Ptr y $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$, se realizaron experimentos para obtener los cromatogramas de fluorescencia (HPLC-FL) y también se realizaron medidas con el equipo de fluorescencia (Capítulo 7), teniendo en cuenta la emisión Tyr_2 ($\lambda_{exc} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 405 \text{ nm}$).

Los cromatogramas de emisión, presentados en la Figura 15.7, muestran un único pico que emite con estas condiciones, lo que puede ser una primera evidencia de la formación de Tyr_2 con $t_r = 4,12 \text{ min}$. Bajo las condiciones experimentales realizadas se observó que hay un incremento en el área correspondiente a este pico en función del tiempo de irradiación (Figura 15.7 (a)) y además es un comportamiento similar a lo

observado anteriormente, es decir, después de un tiempo de irradiación disminuye lentamente, lo que podría indicar que los dímeros están siendo degradados por irradiación directa o por una reacción fotosensibilizada con Ptr, efecto que fue evidenciado en la Tyr libre en capítulos anteriores (Capítulo 9).

Con el fin de confirmar la formación de Tyr₂, se aisló P₂, para medir el espectro de emisión de este producto. Las condiciones de emisión fueron similares a las descritas anteriormente ($\lambda_{\text{exc}} = 310\text{nm}$ - $\lambda_{\text{em}} = 360 - 480\text{ nm}$), y los resultados se presentan en la Figura 15.7 (b), donde se observa la banda característica de Tyr₂ centrada en 405 nm.

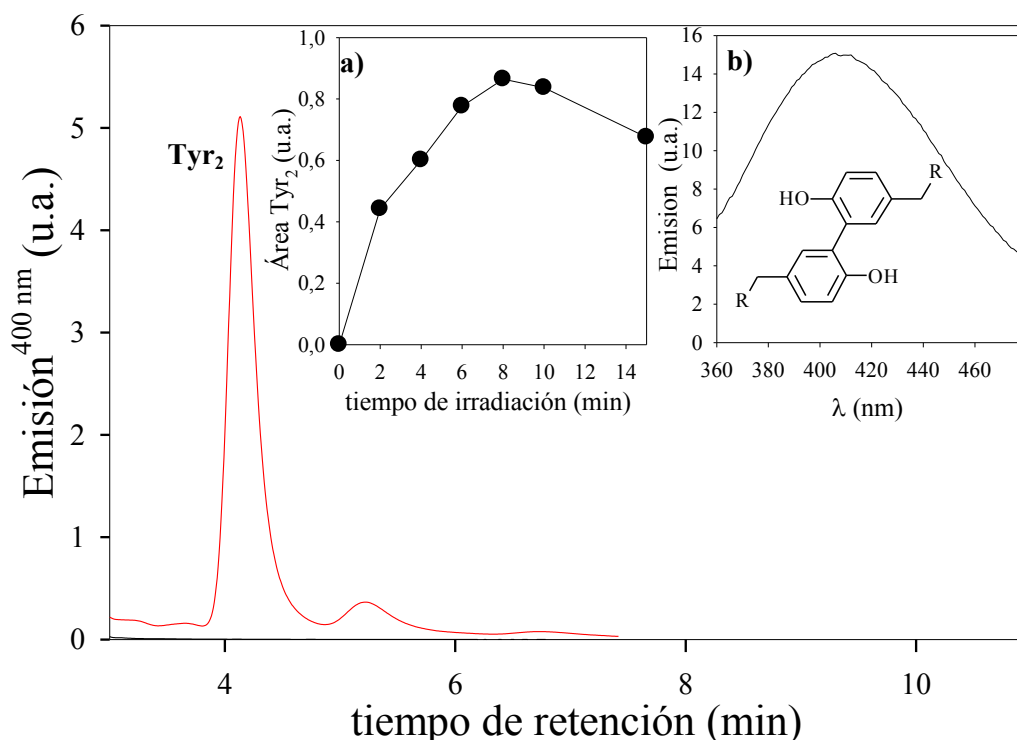


Figura 15.7. Cromatogramas de fluorescencia de una solución irradiada con las condiciones Tyr₂. (a) Formación de Tyr₂. (b) Espectro de emisión de los dímeros aislados por HPLC y medidos en el fluorómetro. [Ptr]₀ = 50 μM; [α-MSH_{W9G}]₀ = 46 μM; $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400\text{nm}$; pH = 5,5.

15.2.2 Fluorescencia

Una evaluación más clara de la formación de Tyr₂ generada por la reacción de fotosensibilización entre la Ptr y α-MSH_{W9G}, se realizó analizando los cambios espectrales de fluorescencia en el rango de emisión de Tyr₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 310\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350-420\text{nm}$). En este rango de medida, la Ptr absorbe y fluoresce con un máximo a 439nm, así que la emisión del fotosensibilizador está parcialmente superpuesta a la emisión de Tyr₂. Por lo tanto, los espectros de las soluciones irradiadas, le fueron restados la

emisión de la Ptr, debido que esta no cambia en el tiempo de irradiación. Los resultados muestran, que se genera la banda característica de Tyr₂ (Figura 15.8 (a)) y además crece en función del tiempo de irradiación, como se demostró anteriormente con Tyr libre. Estos resultados parciales pueden ser una clara evidencia de la la formación de la Tyr₂ y la oxidación del péptido en la reacción fotosensibilizada de α -MSH_{W9G} por Ptr.

Todos estos resultados demuestran que la oxidación del péptido ocurre al menos sobre el residuo de Tyr y que se genera Tyr₂ en un entorno peptídico. Además, se puede confirmar que la dimerización observada en la α -MSH (Capítulo 13), se da por formación de Tyr₂ ya que en ausencia de Tyr (Capítulo 14) no se observó la formación de este producto. La detección de Tyr₂ es importante desde el punto de vista biológico porque implica que la Ptr puede fotoinducir la oligomerización y el *cross-linking* de proteínas y en este caso de péptidos de cadena corta.

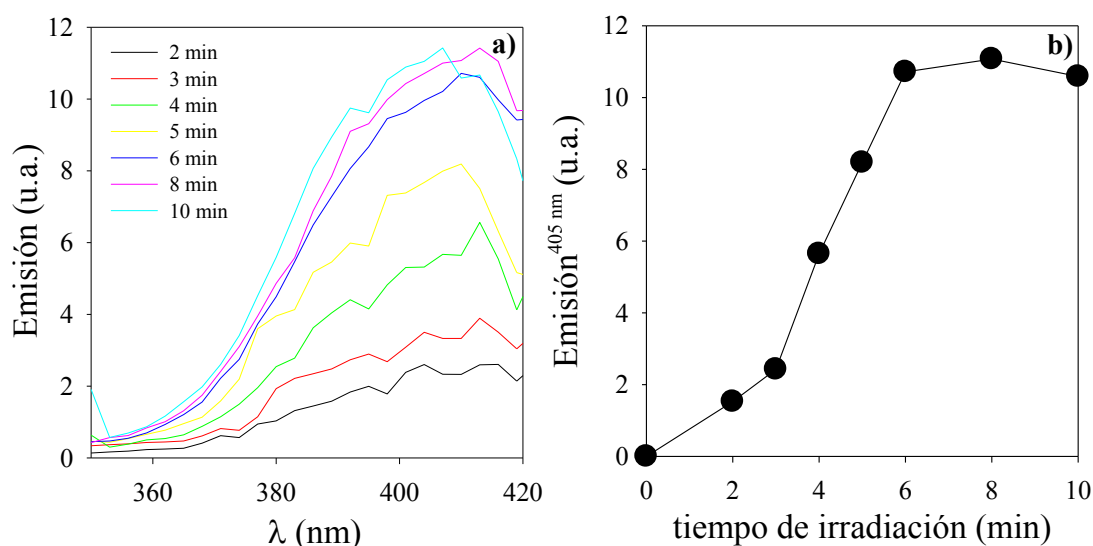


Figura 15.8. (a) Espectro de fluorescencia corregido de soluciones acuosas de Ptr y α -MSH_{W9G} irradiadas a 350 nm. Para cada tiempo, fue sustraído el espectro de emisión del tiempo cero. **(b)** Evolución de la intensidad de fluorescencia a 405 nm en función del tiempo de irradiación. $[\text{Ptr}]_0 = 20\mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 45\mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350 - 420\text{ nm}$; pH 5,5; $l = 1\text{cm}$.

15.2.3 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

La detección de los productos oxigenados y de otros productos fueron analizados por UPLC acoplado a espectrometría de masas (Sección 7.1.3), después de ser irradiadas las muestras que contenían α -MSH_{W9G} y Ptr a pH 5,5. El análisis de masa fue llevado a cabo en modo positivo y modo negativo (ESI⁺ y ESI⁻), sin embargo las señales en modo positivo fueron más claras y se decidió trabajar en este modo para observar mejores señales.

La fórmula molecular de α -MSH_{W9G} es C₆₈H₁₀₃N₂₀O₁₉S y su peso molecular es 1535,6952Da. Los cromatogramas obtenidos de las soluciones fotolizadas mostraron la aparición de nuevos picos con tiempos de retención menores al pico que corresponde al péptido y un pico con t_r mayor. Es importante aclarar que los t_r son diferentes a los obtenidos por HPLC-PDA, dado que las condiciones de medidas en este caso fueron otras (equipo, fase móvil, columna y flujo), pero el orden de salida de cada compuesto coincide.

Las soluciones sin irradiar mostraron dos picos con t_r 6,74 min y 8,61 min, los cuales fueron asignados a la Ptr y α -MSH_{Y2G} respectivamente (Figura 15.9 (a)). Los cromatogramas de masas de las soluciones irradiadas mostraron la aparición nuevos picos con t_r menores al péptido y un pico con t_r mayor (Figura 14.14 (b)).

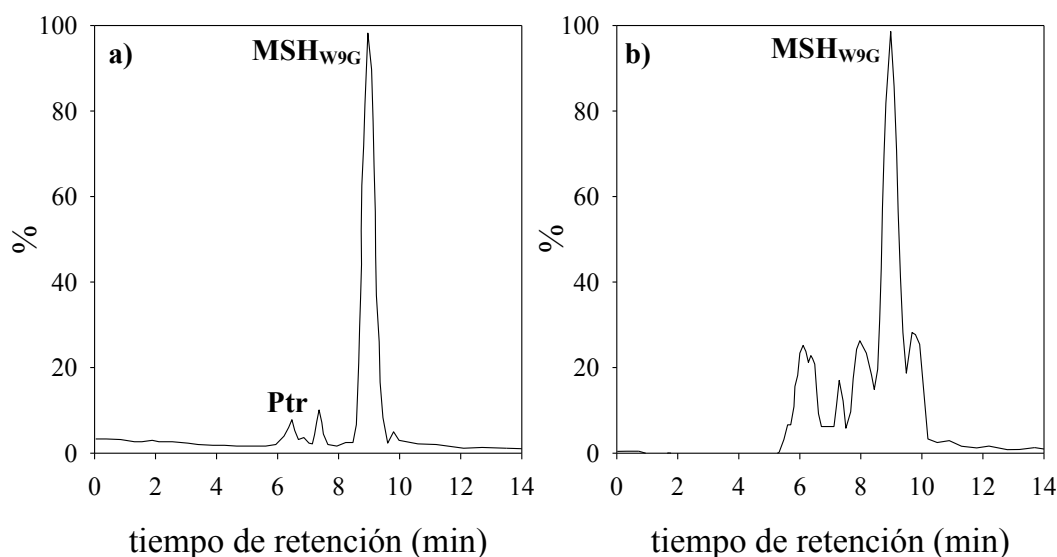


Figura 15.9. Cromatogramas de masas registrados de soluciones que contenían α -MSH_{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. (a) 0 min. (b) 12 min. [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{Y2G}]₀ = 50 μ M; pH = 5,5.

El espectro de masas de α -MSH_{W9G} del tiempo cero de irradiación mostró un grupo de señales que corresponden al ion monocargado, di-cargado y tricargado a $m/z \sim 1537,7$ Da, $m/z \sim 768,8$ Da y $m/z \sim 512,5$ Da, respectivamente. El grupo de señales en el que se observó mejor intensidad fue las correspondientes al ion di-cargado con respecto al ion monocargado (Figura 15.10). Por otra parte, también fue detectado el espectro MS del ion molecular intacto de Ptr, a m/z 164,0566 Da.

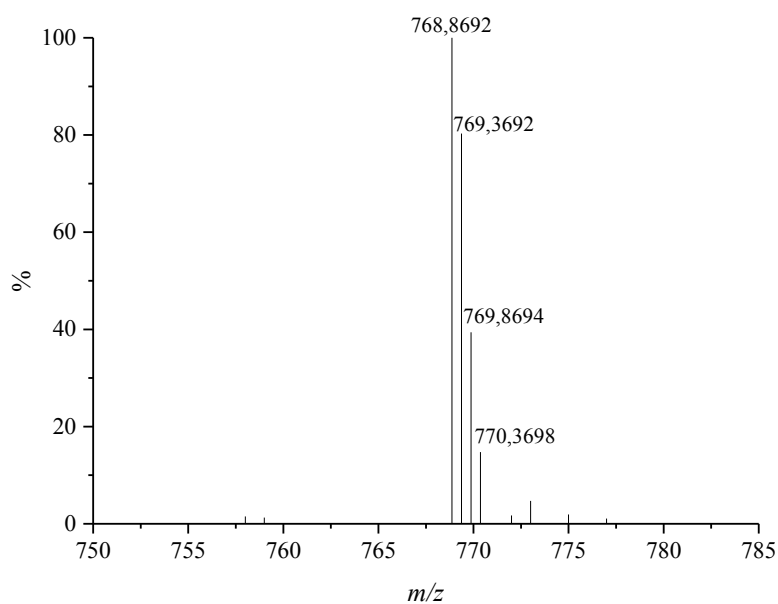


Figura 15.10. Espectros MS del pico correspondientes a α -MSH_{w9G}, registrados en soluciones equilibradas con aire sin irradiar; [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{w9G}]₀ = 320 μ M; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

El espectro de masas del producto generado con t_r 6,45 min (P₁') mostró un ion predominante con m/z 776,81 Da, el cual corresponde a la incorporación de un átomo de oxígeno. Los cromatogramas de masas obtenidos a m/z fijo, mostró la formación de un solo pico, el cual aumenta en función del tiempo de irradiación.

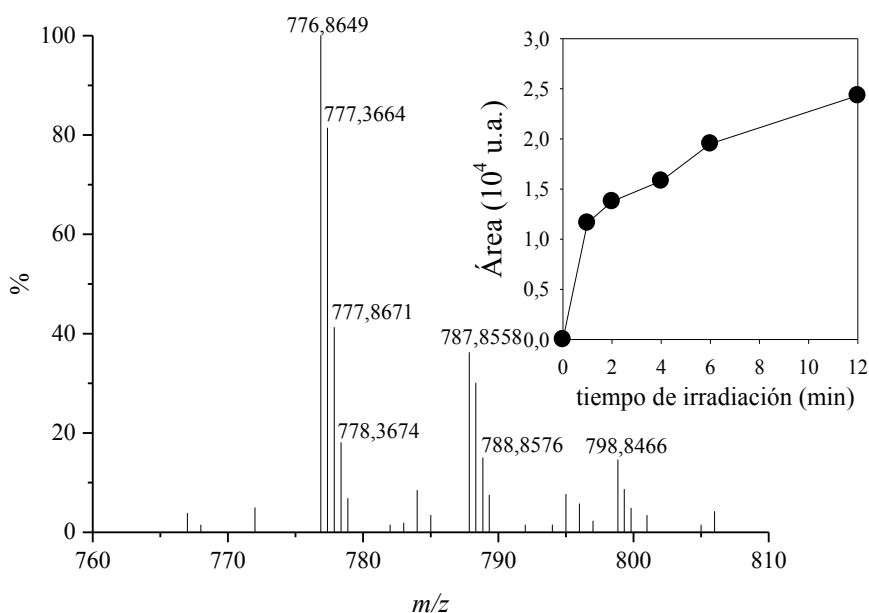


Figura 15.11. Espectro de masas del producto con t_r 6,45 min de soluciones irradiadas de α -MSH_{w9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. Inset: Formación del producto en función del tiempo de irradiación [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{w9G}]₀ = 320 μ M; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

Se tomaron los espectro de masas para los productos con t_r 6,03 min y 5,97 min (P_2' y P_3') donde se identificó el ión molecular a m/z 784,87 Da y m/z 791,8, respectivamente, los cuales corresponde a la incorporación de dos y tres átomos de oxígenos a la molécula de péptido (Figura 15.12 (a) y (b)). La integración del área de los cromatogramas, mostró un aumento en función del tiempo de irradiación para ambos productos.

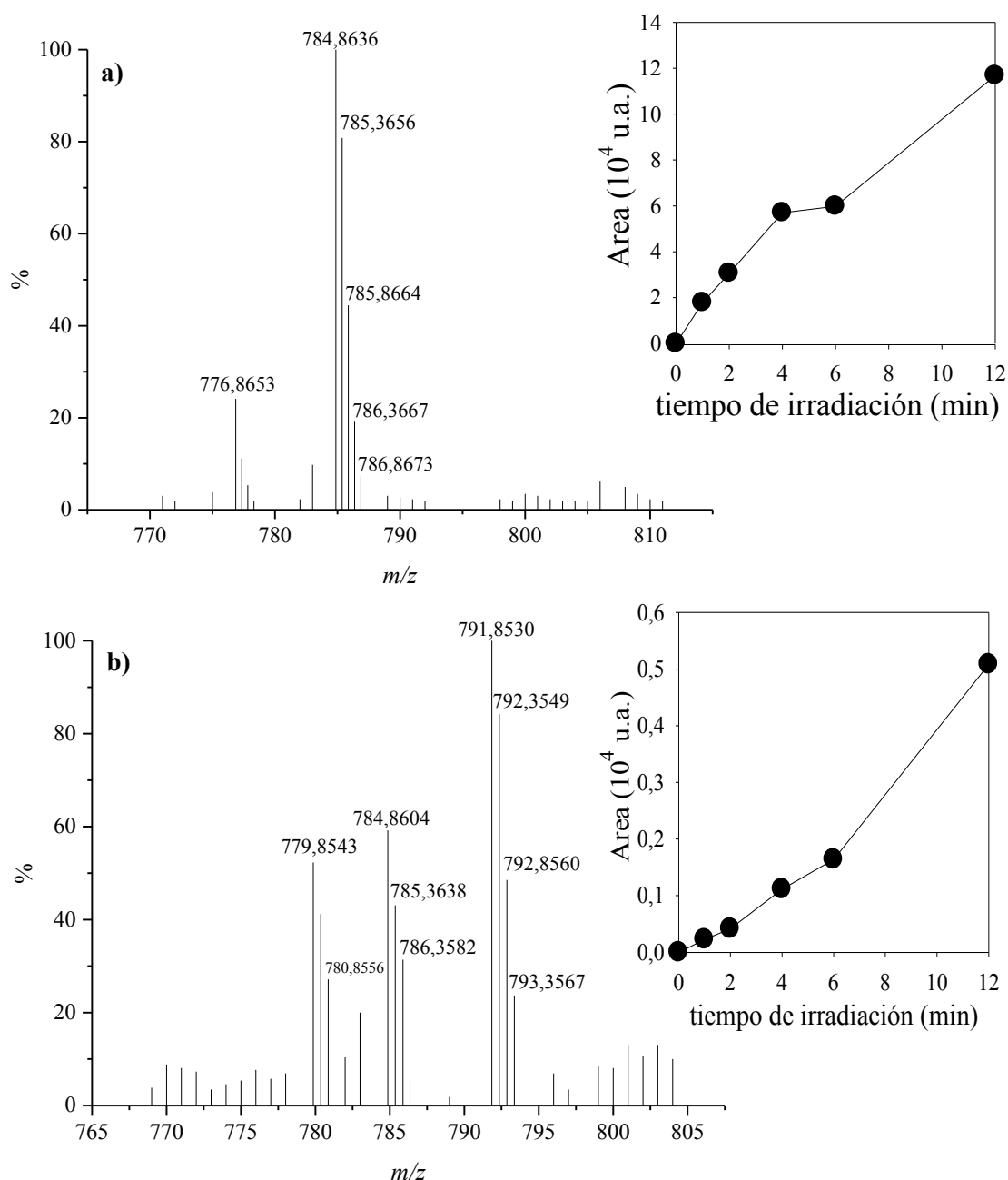


Figura 15.12. Espectro de masas del producto con (a) t_r 6,03 min y (b) 5,97 min de soluciones irradiadas de α -MSH_{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. Inset: Formación del producto en función del tiempo de irradiación. [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{W9G}]₀ = 320 μ M; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

El producto con t_r 8,92 min (P_4') presenta un espectro de masas con un grupo de señales a m/z aproximadamente 1536,2 Da, 1024,4 Da y 768,6 Da. Comparando con el grupo de señales del ion di-cargado del ion intacto, se ve claramente que las señal correspondiente a $m/z \sim 768,8$ Da corresponde a los iones tetra-cargado de una molécula con un peso molecular [2α -MSH_{W9G}-2H] (Figura 15.13). Las señales de 1536,7 Da y 1024,8 Da de los espectros de masas mostrados corresponden a los iones di-cargado y tri-cargado respectivamente. Este resultado confirma que en la reacción hay formación de Tyr₂ y coincide con los resultados obtenidos por HPLC-PDA/FL. El hecho que dos productos muestren el mismo espectro de masas coincide con los análisis de HPLC-RF y pueden atribuirse a los diferentes isómeros de Tyr₂ que se forman. Se realizaron los controles de las soluciones sin irradiar y no se observó generación de productos dimericos

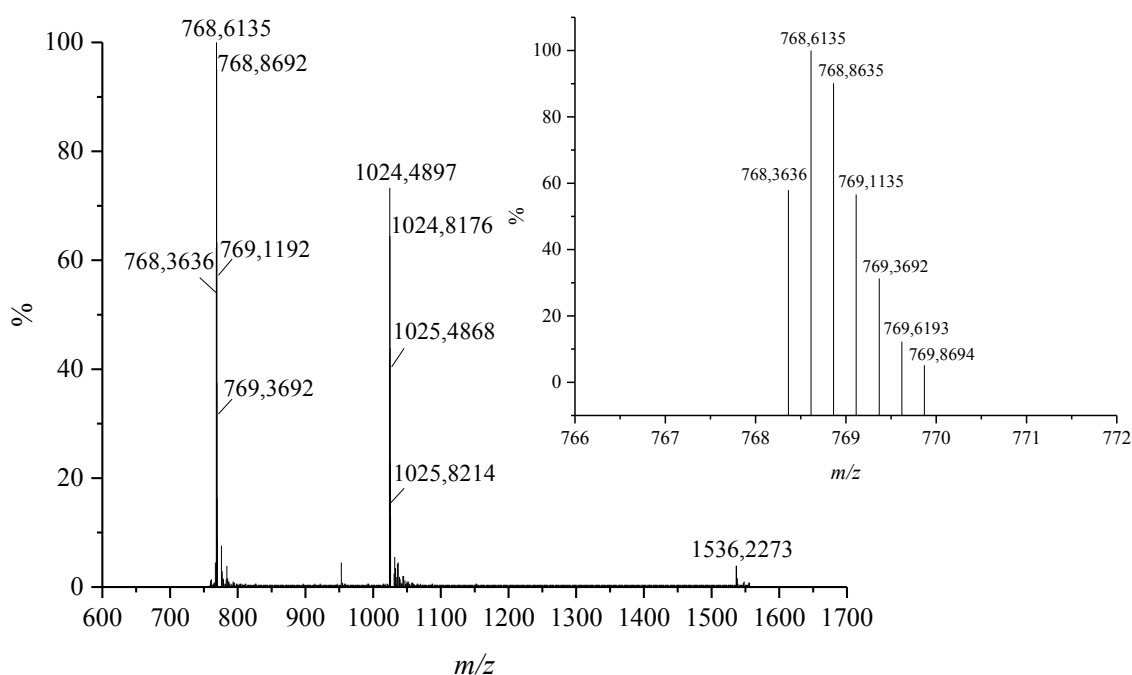


Figura 15.13. Espectros de masas de los productos con t_r 8,92 min de soluciones irradiadas de α -MSH_{W9G} en presencia de Ptr equilibradas con aire. Inset: Espectros de masas de α -MSH_{W9G} del ion tetra cargado; [Ptr]₀ = 50 μ M; [α -MSH_{W9G}]₀ = 50 μ M; pH = 5,5.

Estos resultados indican que bajo irradiación UV-A y en presencia de Ptr, el péptido sufre fotooxidación, además se generan diferentes productos, entre ellos la Tyr₂. Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados anteriormente y los mostrados con α -MSH, se puede afirmar que el residuo de Tyr está envuelto en la oxidación fotosensibilizada con Ptr. Entre los productos que se generan en la reacción se observó la incorporación de hasta tres átomos de oxígeno en el péptido y los dímeros de Tyr. Es

importante aclarar que la oxidación de α -MSH_{W9G}, puede que no solo genere algún daño sobre el residuo de Tyr, sino también sobre otros residuos presentes en el mismo.

En la Tabla 15.1 se resumen los valores de m/z de cada producto extraídos de los espectros de masas a cada t_r .

Tabla 15.1. Valores de m/z para los productos de la reacción fotosensibilizada de Tyr inducida por Ptr en presencia de O_2 .

Producto	t_r (min)	Ion molecular m/z (Da)	
MSH _{W9G}	8,61	768,8	$[\text{MSH}_{\text{W9G}} + 2\text{H}]^{2+}$
P ₁ '	6,45	776,8	$[\text{MSH}_{\text{W9G}} + \text{O} + 2\text{H}]^{2+}$
P ₂ '	6,03	784,8	$[\text{MSH}_{\text{W9G}} + 2\text{O} + 2\text{H}]^{2+}$
P ₃ '	5,97	791,8	$[\text{MSH}_{\text{W9G}} + 3\text{O} + 2\text{H}]^{2+}$
P ₄ '	8,92	768,6	$[2\alpha\text{-MSH}_{\text{W9G}} - 2\text{H} + 4\text{H}]^{4+}$

15.3 Determinación del mecanismo de reacción

15.3.1 Rol del Oxígeno

Se realizaron análisis para tres condiciones de O_2 (equilibradas con aire, saturación de O_2 , Ar), y los resultados se presentan en la Figura 15.14, donde se observa el consumo del péptido y la formación de los productos seguidos por HPLC-PDA/FL. En condiciones de saturación de O_2 se observa una inhibición en el consumo de α -MSH_{W9G} en comparación las soluciones equilibradas con aire, esto se debe al apagamiento de los estados tripletes de la Ptr por el O_2 . Por otra parte, las soluciones burbujeadas con Ar, demostraron que no existe una reacción en estas condiciones, ya que el consumo del péptido es despreciable (Figura 15.14 (a)). Es importante aclarar que el consumo que se observa en estas condiciones, se puede deber al O_2 residual que queda en la celda. Este resultado puede llevar a concluir que para que tome lugar esta reacción fotosensibilizada, el O_2 debe estar presente.

En la Figura 15.14 (b) y (c) se presenta el efecto de la concentración de O_2 en la formación de los productos que se observaron por cromatografía. En el caso de Tyr₂ se cuantificó por HPLC-FL y los resultados se presentan en la Figura 15.14 (b), donde se

puede observar que la generación de este producto en soluciones saturadas de O_2 es menor en comparación con la formación en soluciones equilibradas con aire. Además la formación de Tyr_2 en ausencia de O_2 también se vió inhibida.

Por otra parte, el producto P_1 encontrado por cromatografía (Sección 15.1.2), fue cuantificado y se observó que la formación en ausencia de O_2 es menor. En el caso de las soluciones con saturación de O_2 , se observó una inhibición en la formación en comparación con las soluciones aireadas.

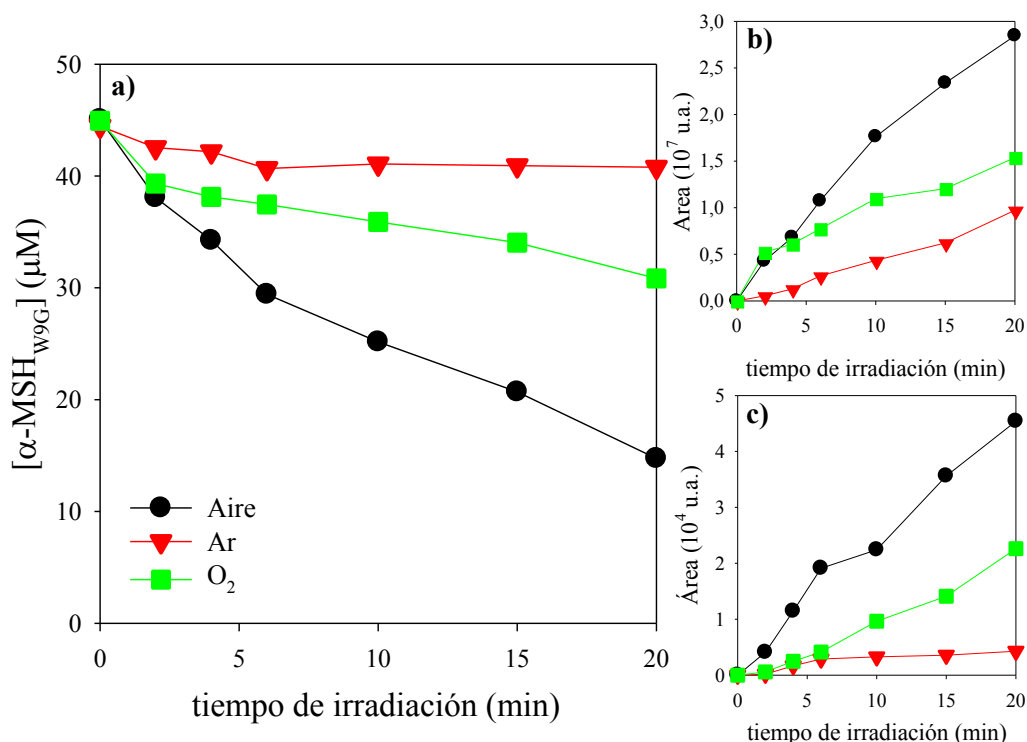


Figura 15.14. Evolución de las concentración de soluciones acuosas equilibras con Aire y saturadas con Ar y O_2 en función del tiempo de irradiación. **(a)** α -MSH_{w9G}, **(b)** Formación de Tyr_2 ($\lambda_{exc} = 310$ nm, $\lambda_{em} = 405$ nm). **(c)** Formación de P_1 . $[\alpha\text{-MSH}_{w9G}]_0 = 45\mu\text{M}$; $[Ptr]_0 = 50\mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1$ cm.

15.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Se realizaron medidas de soluciones acuosas que contenían Ptr y α -MSH_{w9G} en presencia y en ausencia de KI (400 μ M), se compararon y se observó el efecto que hay en la velocidad del consumo del sustrato en la reacción. La presencia de KI provocó una inhibición prácticamente completa en el consumo del residuo de Tyr presente en el péptido y por lo tanto en la consecuente formación de los productos (Figura 15.15). Como era de esperarse, estos resultados demuestran que el $^3Ptr^*$ es el responsable de iniciar el proceso de fotosensibilización.

Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente para Tyr, en donde se estableció que la reacción es iniciada por una transferencia de electrones desde el estado triplete de la Ptr al estado basal del sustrato.

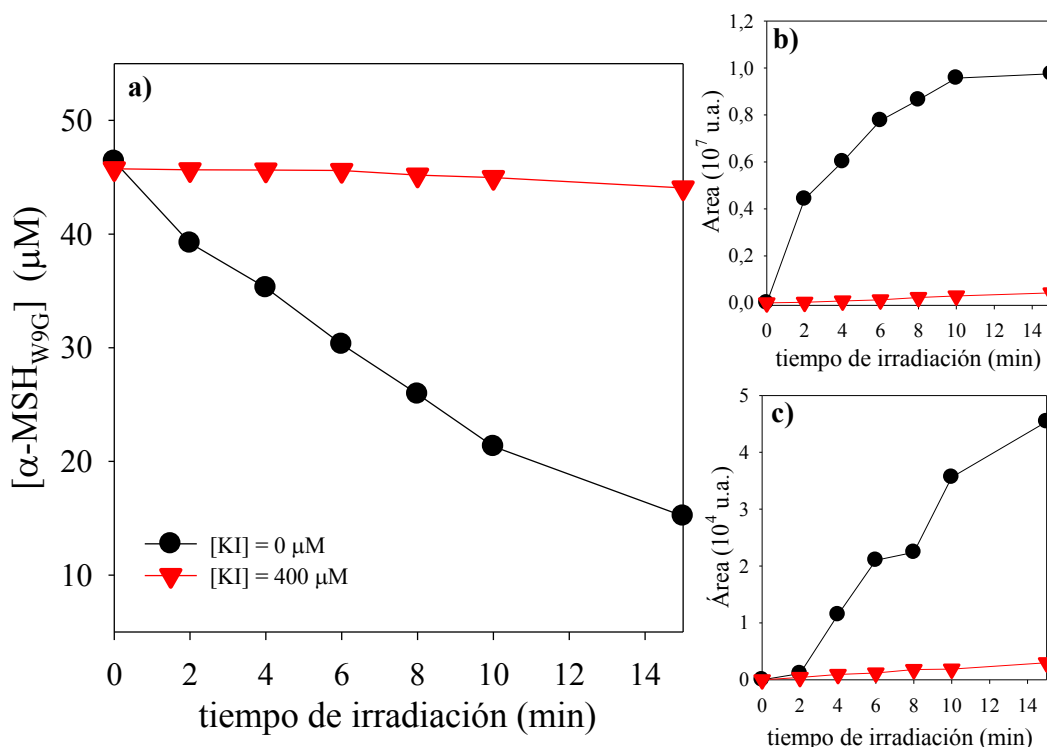


Figura 15.15. Evolución de la concentración de soluciones acuosas equilibradas con Aire en presencia y ausencia de KI. **(a)** $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$. **(b)** Formación de Tyr_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$). **(c)** Formación de P_1 . $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 46 \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\text{KI}] = 400 \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

15.3.3 Contribución de la oxidación por $^1\text{O}_2$

Después de realizadas las fotólisis de las soluciones en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, se siguió el consumo del péptido y se comparó la velocidad inicial en cada medio. Como se puede observar en la Figura 15.16 el consumo de $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$ en D_2O es mayor que en H_2O , pero no lo suficiente para afirmar que el mecanismo tipo II predomina en esta reacción. Si se tiene en cuenta el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en D_2O , se debería acelerar mucho más el consumo del sustrato, en el caso que especie estuviera interviniendo, por lo tanto, se puede afirmar que el $^1\text{O}_2$ podría estar participando en la reacción, pero no es la especie que predomina para la oxidación de $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$. Por otra parte, el efecto observado para la formación de los productos Tyr_2 y P_1 , demostró que existe una inhibición en ambos casos en el solvente deuterado, confirmando que para la formación de estos productos no predomina esta especie oxidante.

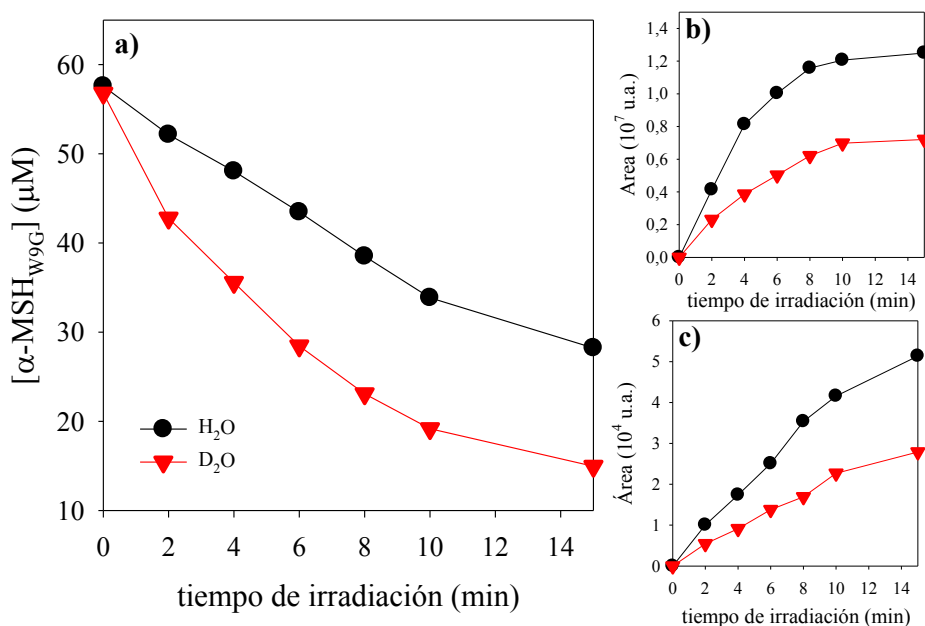


Figura 15.16. Evolución de la concentración de soluciones en D_2O y H_2O en función del tiempo de irradiación. **(a)** α -MSH_{w9G}. **(b)** Formación de Tyr_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm). **(c)** Formación de P_1 . $[\alpha\text{-MSH}_{\text{w9G}}]_0 = 56 \mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; pH 5,5; $l = 1$ cm.

Por otra parte, la contribución de $^1\text{O}_2$ para la reacción fotosensibilizada de (-Tyr-) por Ptr se puede evaluar, comparando la velocidad inicial de consumo de (-Tyr-) y la velocidad calculada de la reacción entre (-Tyr-) y $^1\text{O}_2$.

$$\left(\frac{d[(-\text{Tyr-})]}{dt} \right)_{0,\text{calc}} = k_r[(-\text{Tyr-})][^1\text{O}_2] \quad (15.1)$$

La velocidad de reacción entre el $^1\text{O}_2$ y (-Tyr-) se puede calcular utilizando el método explicado en el Capítulo 1, para luego compararla con la velocidad inicial calculada experimentalmente por análisis de HPLC-PDA. Los resultados se pueden observar en la Tabla 15.2, en donde se puede observar que la velocidad experimental es mayor que la calculada, confirmando así que el mecanismo tipo II, en cual interviene el $^1\text{O}_2$ no juega un papel predominante y por lo tanto no es el mecanismo principal en la oxidación de α -MSH_{w9G} y por lo tanto del residuo de Tyr.

Tabla 15.2. Velocidades iniciales de consumo de α -MSH_{w9G} experimental y calculada para la reacción de $^1\text{O}_2$ y α -MSH_{w9G}

	Experimental ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Calculada* ($\mu\text{M}/\text{min}$)
H_2O	$2,34 \pm 0.04$	0,016
D_2O	$4,1 \pm 0.5$	0,26

*Este valor fue calculado para la reacción con $^1\text{O}_2$

15.3.4 Irradiación en presencia de SOD

Se realizaron análisis de las soluciones de Ptr y α -MSH_{W9G} en presencia y en ausencia de SOD, tal y como se ha explicado en los capítulos anteriores. Los resultados presentados en la Figura 15.17, mostraron un aumento en la velocidad de consumo de α -MSH_{W9G} en presencia de SOD. Este resultado puede sugerir que el $O_2^{\bullet-}$ no reacciona apreciablemente con α -MSH_{W9G}, debido que al eliminar el reactivo se observa un aumento en la velocidad de consumo. Este comportamiento se puede explicar a partir de la eliminación del $O_2^{\bullet-}$ medio, se estaría eliminando o impidiendo la vía de recuperación del sustrato. Los productos formados mostraron una mayor producción en presencia de la enzima, lo cual puede ser una evidencia de que un mecanismo tipo I es el que interviene para la formación de Tyr₂ y P₁.

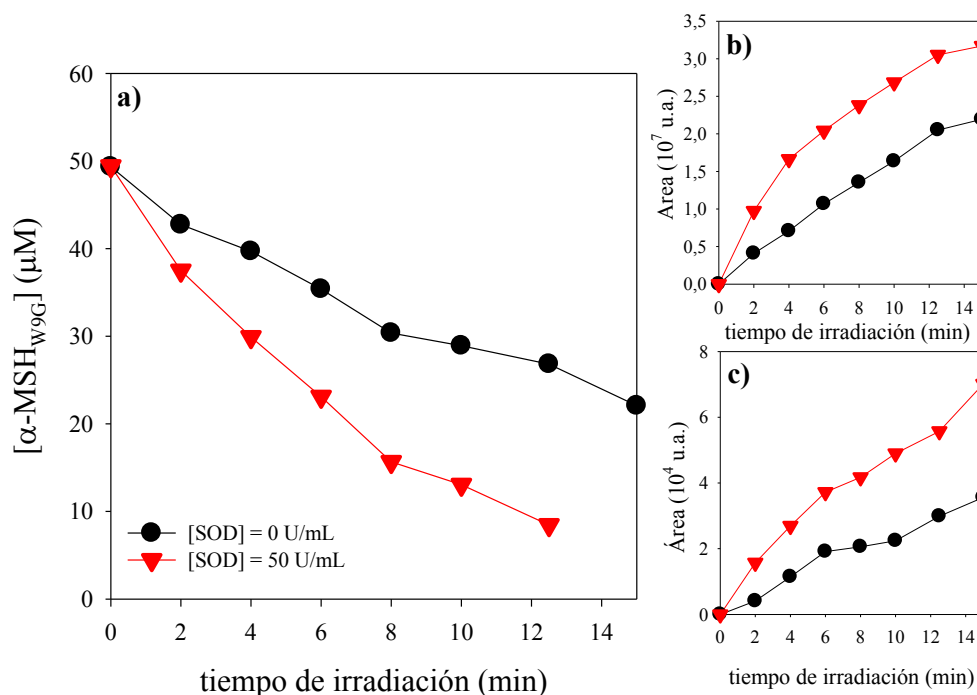


Figura 15.17. Evolución de la concentración de soluciones en función del tiempo de irradiación en presencia y ausencia de SOD, **(a)** α -MSH_{W9G}. **(b)** Formación de Tyr₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 405$ nm). **(c)** Formación de P₁. $[\alpha\text{-MSH}_{W9G}]_0 = 49\mu\text{M}$; $[\text{Ptr}]_0 = 50\mu\text{M}$; $[\text{SOD}] = 50$ U/ mL; pH 5,5; $l = 1$ cm.

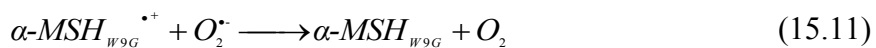
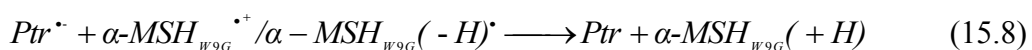
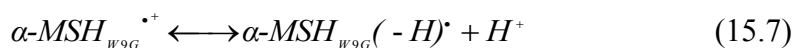
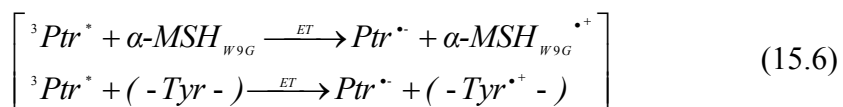
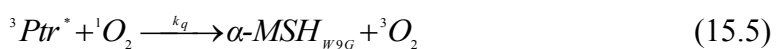
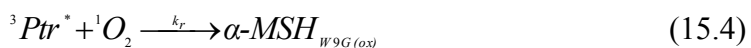
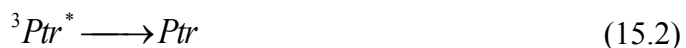
15.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

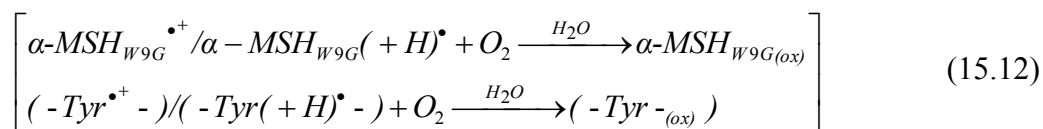
Como se ha aclarado en capítulos anteriores, la reacción inicia con la generación de estado triplete de la Ptr ($^3\text{Ptr}^*$) por la absorción de fotones (Reaccion (15.1)). Desde este punto existen diferentes formas de desactivación del estado excitado, primero la

desactivación por conversión interna del fotosensibilizador lo que lo llevaría a su estado fundamental (Reacción (15.2)); Segundo por transferencia de energía al oxígeno en estado fundamental, lo que llevaría a la generación de oxígeno singlete (Reacción 15.3); Y el tercero es la transferencia de electrones (ET) del sustrato en estado fundamental a $^3Ptr^*$, llevando así a la formación del par radical $MSH_{W9G}^{\bullet+}/(-Tyr^{\bullet+})$ y $Ptr^{\bullet-}$ (Reacción 15.6).

Los siguientes pasos de reacción son la recombinación de los radicales, que los lleva a su estado fundamental (Reacción 15.8), esto se puede ver más claro con el poco consumo del péptido que se observa al burbujear las soluciones con Ar (ausencia de O_2). La Ptr puede transferir su electrón al oxígeno y generar así $O_2^{\bullet-}$ (Reacción 15.9).

Este radical puede tomar dos caminos, el primero dismuta con su ácido conjugado y llevar a la formación de H_2O_2 (Reacción 15.10) y el segundo es reaccionar con $MSH_{W9G}^{\bullet+}$ para regresarlo a su estado fundamental (α - MSH_{W9G}) (Reacción 15.11). Un grupo de reacciones de procesos que se resumen en la Reacción 15.12, muestran la oxidación a la que puede ser llevado el péptido en presencia de O_2 y H_2O . Finalmente, el radical catión puede reaccionar con otro radical y generar la dimerización que contribuye al consumo del residuo de Tyr y por lo tanto de α - MSH_{W9G} (Reacción 15.13).





Esquema 15.1. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de fotosensibilización de $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$ por Ptr a pH 5,5.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en soluciones aireadas, se puede decir que la velocidad de consumo del sustrato con la Reacción 15.6, además que puede ser la etapa principal para la generación de los Tyr_2 . Por otra parte, en soluciones saturadas de oxígeno, la Reacción 15.3 compite eficientemente con la Reacción 15.6, es decir, la cantidad de $^3Ptr^*$ que reaccionan con $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$ es mucho menor y por lo tanto el consumo del péptido es más bajo (Figura 15.14).

15.4 Conclusiones

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que existe una reacción fotosensibilizada entre la Ptr y $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$, específicamente sobre el residuo de Tyr, en donde hay degradación del péptido mientras la concentración de Ptr permanece constante. El análisis del mecanismo confirmó que el rol del 1O_2 producido por transferencia de energía desde el estado triplete al O_2 disuelto es despreciable. Mientras que un mecanismo iniciado por transferencia de electrones desde la $\alpha\text{-MSH}_{W9G}$ al estado triplete de la Ptr (mecanismo tipo I) predomina en la reacción fotosensibilizada. Luego se genera una transferencia de electrones del radical anión de la Ptr ($Ptr^{\bullet-}$) al O_2 , regenerando el fotosensibilizador y formando $O_2^{\bullet-}$ el cual puede dismutarse para generar H_2O_2 . El radical catión se puede localizar sobre el residuo de Tyr ($\alpha\text{-MSH}_{W9G} (-Tyr^{\bullet+} -)$), el cual se somete a diferentes reacciones que conllevan a la degradación del péptido.

Los productos identificados se dividen en dos partes, la incorporación de hasta 3 átomos de oxígeno a la MSH_{W9G} y además se evidenció la formación de diferentes productos con pesos moleculares mayores, correspondientes a dos moléculas del péptido, identificado en este caso Tyr_2 ,

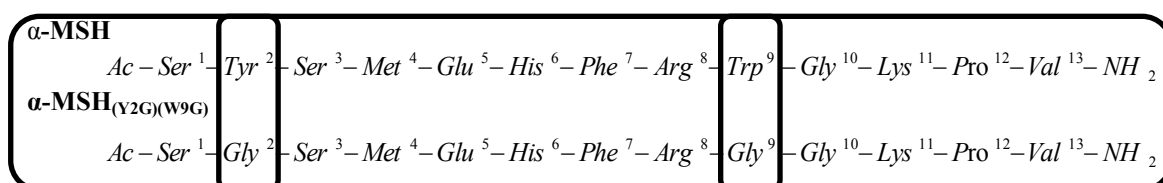
Bibliografía

1. Dalsgaard, T. K.; Otzen, D.; Nielsen, J. H.; Larsen, L. B. . ; *J. Agric. Food. Chem* **55**, 10968–10976 (2007).

2. Heinecke, J. W.; Li, W.; Daehnke, H. L.; Goldstein, J. A. ; *J. Biol. Chem.*; **268**, 4069–4077 (1993).
3. Joschek, H. I.; Miller, S. I. ; *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3273–3281 (1996).

Capítulo 16: Degradación fotosensibilizada de histidina y metionina en entorno peptídico

Como se demostró en los capítulos anteriores, los residuos de Trp y Tyr de la α -MSH son oxidables por Ptr en procesos fotosensibilizados a través de un mecanismo tipo I. Pero además, dentro de la secuencia de este péptido existen otros residuos que también pueden ser oxidables, entre los cuales se encuentra la histidina (His). En el Capítulo 10 se demostró que este aminoácido en su forma libre puede ser oxidado en presencia de Ptr y que su mecanismo es altamente dependiente del pH. Para estudiar el efecto que hay sobre la His en una cadena peptídica, se decidió mutar los residuos de Tyr y Trp en la secuencia de la α -MSH, por un aminoácido que no sea susceptible a la oxidación, en este caso se sustituyó por Gly, denominando este péptido α -MSH_{(Y2G)(W9G)}.



16.1 Evaluación de la capacidad de Ptr para fotosensibilizar α -MSH_{(Y2G)(W9G)}.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente para la His en su forma libre (Capítulo 10), se estudió el proceso fotosensibilizado de soluciones acuosas que contienen Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en medio ácido (pH~5,5) y medio alcalino (pH~10,5), las cuales fueron expuestas a radiación UV-A (Sistema I de irradiación, *Sección 6.3.1*) por diferentes periodos de tiempo. Las muestras irradiadas se analizaron por espectroscopia *UV-Visible*, *HPLC-PDA* y *ULPC-MS*.

En la Figura 16.1 se presentan los espectros de absorción del fotosensibilizador y α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, en donde se puede observar que la Ptr puede absorber radiación a 350 nm, mientras que el péptido no absorbe, asegurando que la luz irradiada será absorbida únicamente por el fotosensibilizador en ambas condiciones de pH. Además se puede observar un pico de baja intensidad alrededor de 250 nm, que puede adjudicarse a la absorción de la fenilalanina (Phe), el cual es un aminoácido que no es susceptible a la oxidación por Ptr.

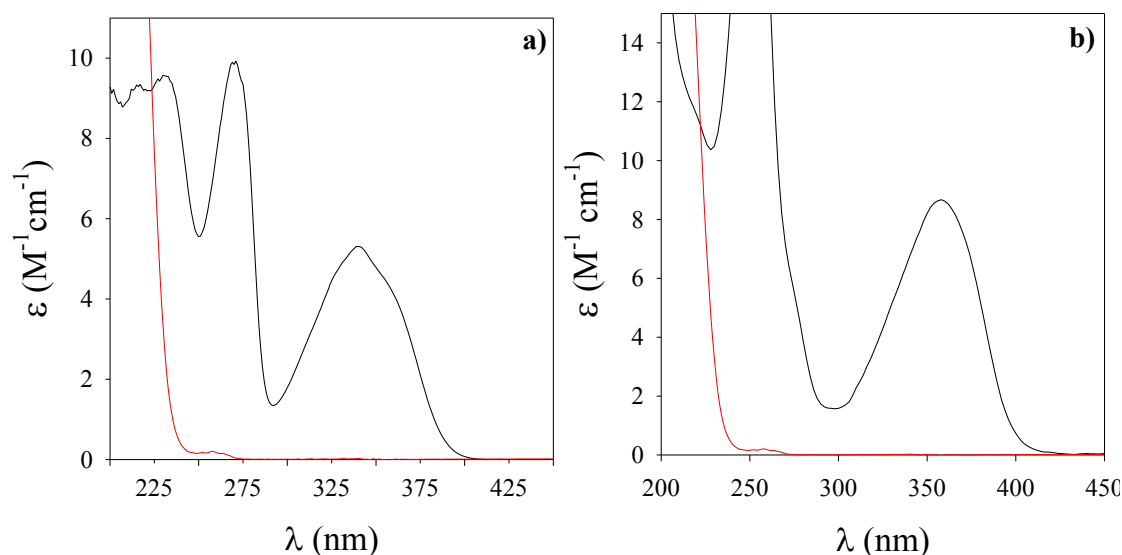


Figura 16.1. Espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)}. **(a)** pH~5,5; **(b)** pH~10,5.

16.1.1 Análisis espectroscópico

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, en donde se demostró que la Ptr es capaz de fotosensibilizar la oxidación de la His en su forma libre (Capítulo 10), se evaluó el cambio en los espectros de absorción de las soluciones irradiadas que contenían Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en ambas condiciones de pH. En la Figura 16.2, se presentan los cambios espectrales en función del tiempo de irradiación, en donde se observa claramente que en ambas condiciones de pH se genera un cambio químico debido a la reacción fotosensibilizada.

En medio ácido (Figura 16.2 (a)), se observó una disminución en el espectro de absorción a longitudes de onda bajas, mientras a longitudes mayores hubo un aumento. Por otra parte, en medio alcalino (Figura 16.2 (b)), los cambios espectrales fueron principalmente a longitudes de onda cerca de la longitud de absorción del residuo de His ((-His-), 210 nm).

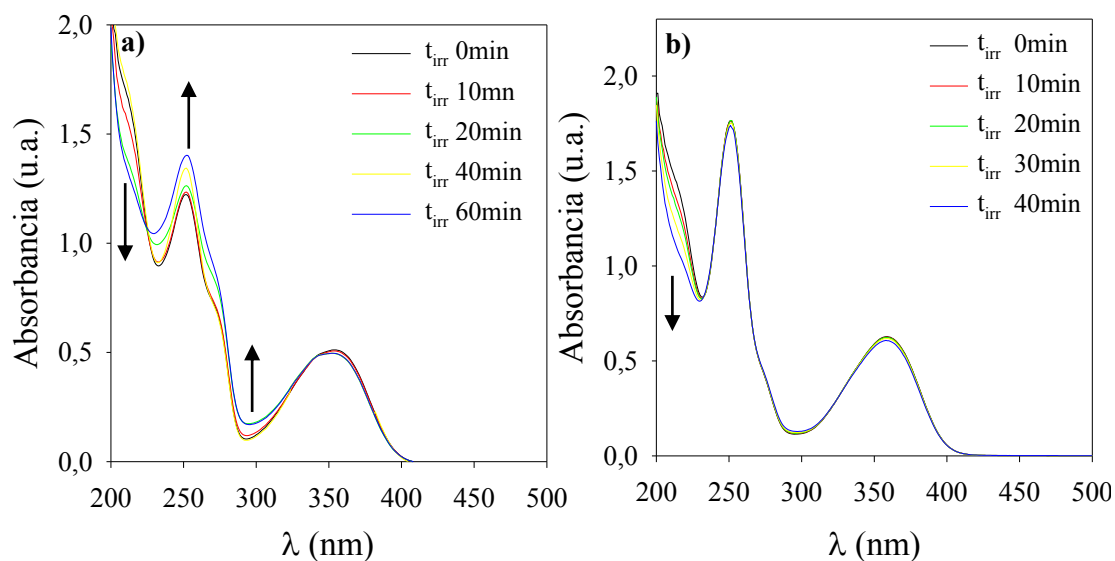


Figura 16.2. Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} y Ptr equilibradas con aire en función del tiempo de irradiación: **(a)** pH 5,5. **(b)** pH 10,5. $[Ptr]_0 = 50 \mu M$; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 = 50 \mu M$; $\lambda_{irr} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

16.1.2 Análisis Cromatográfico y formación de H_2O_2

Las soluciones irradiadas se analizaron con HPLC-PDA utilizando la columna Jupiter Proteo y la Fase Móvil III (Capítulo 7), para cuantificar el consumo de los reactivos e investigar la formación de productos.

En la Figura 16.3 se presentan los cromatogramas obtenidos a 220nm en condiciones ácidas, en donde se puede observar en un pico con $t_r = 12,41 \text{ min}$, el cual corresponde al péptido. Es importante aclarar que en la figura no se muestra el pico de la Ptr, pero se cuantificó en todo el tiempo de irradiación y no se observó ningún cambio apreciable. Por otra parte, los cromatogramas de las soluciones irradiadas mostraron una disminución del pico correspondiente al péptido y además la formación de diferentes productos, denominados $P_1^{5,5}$ y $P_2^{5,5}$, con t_r menores, lo que podría indicar que se están generando productos más polares que α -MSH_{(Y2G)(W9G)}. En medio alcalino, se realizaron medidas similares y los cromatogramas obtenidos se presentan en la Figura 16.4, en este caso también se observó el mismo comportamiento de los reactivos mencionado anteriormente, además se generan dos productos, denominados $P_1^{10,5}$ y $P_2^{10,5}$, con $t_r = 5,10 \text{ min}$ y $10,20 \text{ min}$ respectivamente.

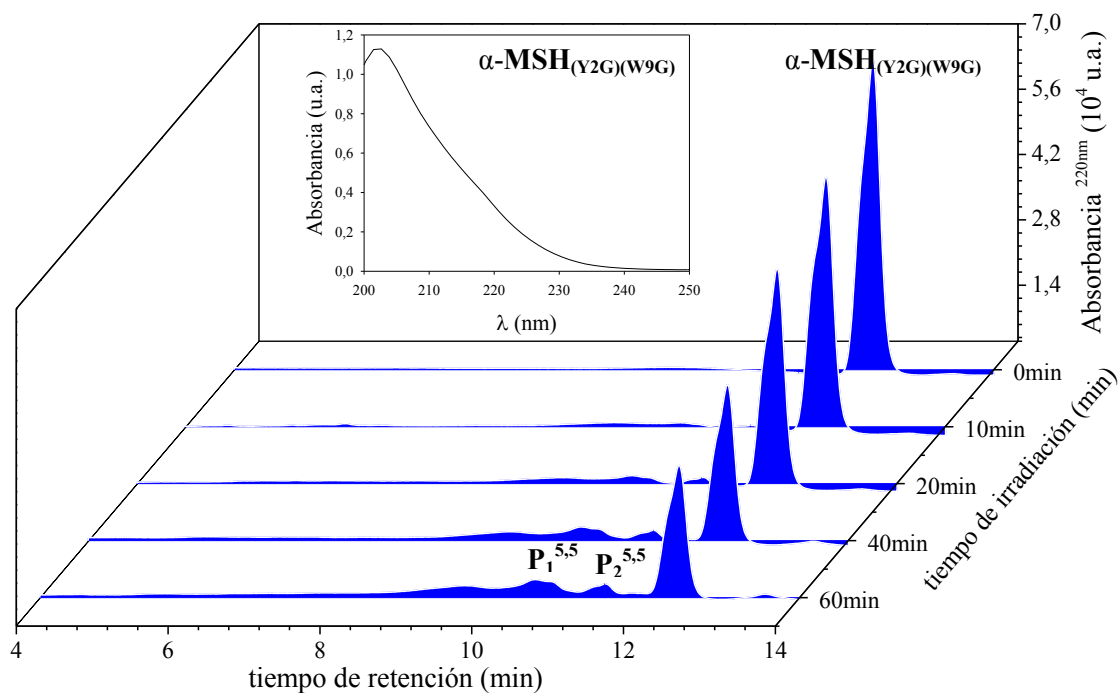


Figura 16.3. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} aireadas. Inset: Espectro de absorción del péptido tomado con por HPLC-PDA. $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 = 50 \mu\text{M}$; pH = 5,39; $\lambda_{\text{ana}} = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; pH 5,5; $l = 1 \text{ cm}$.

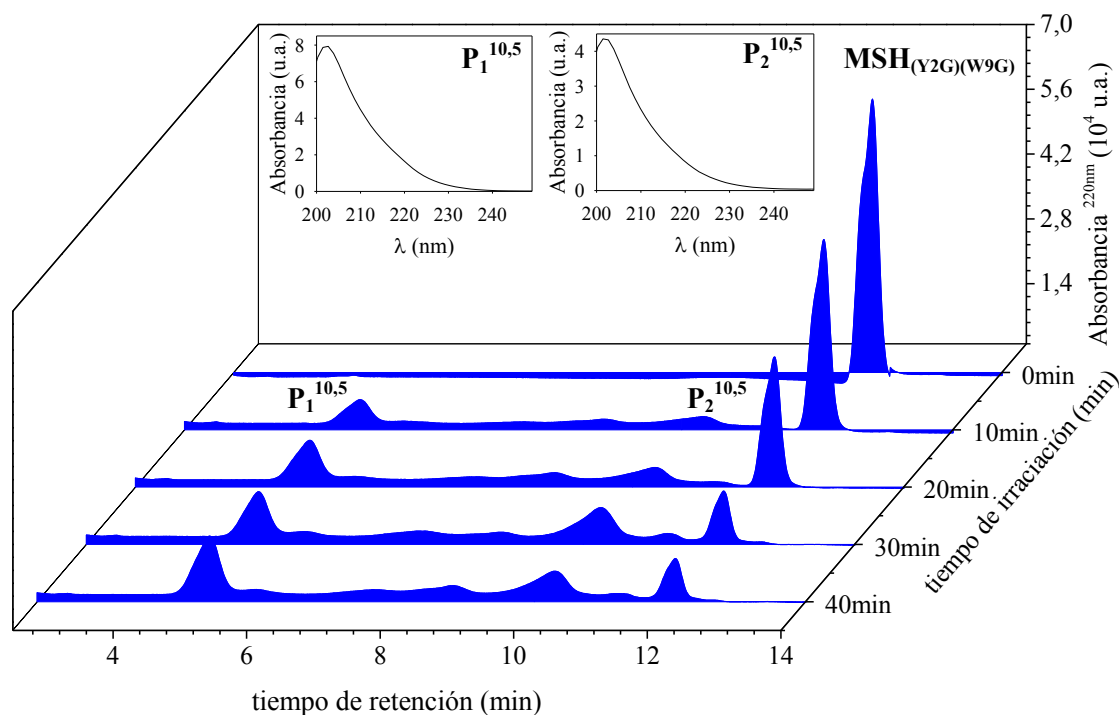


Figura 16.4. Cromatogramas registrados a distintos tiempos de irradiación para una solución de Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} aireadas. Inset: Espectros de absorción de $P_1^{10,5}$ y $P_2^{10,5}$ tomado con HPLC-PDA. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 = 50 \mu\text{M}$; pH = 10,41; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; pH = 10,5; $l = 1 \text{ cm}$.

Los perfiles de concentración del pico correspondiente al péptido y a la Ptr se presentan en la Figura 16.5, donde se observa con mayor claridad el consumo del péptido. En el caso del medio ácido el consumo es menor en comparación con pH alcalino en un tiempo aproximado de 40 min. También se presentan los perfiles de formación de los productos en ambas condiciones de pH, los cuales se analizarán más adelante. Por otra parte, la concentración de la Ptr no cambió considerablemente durante el tiempo que se realizó el experimento.

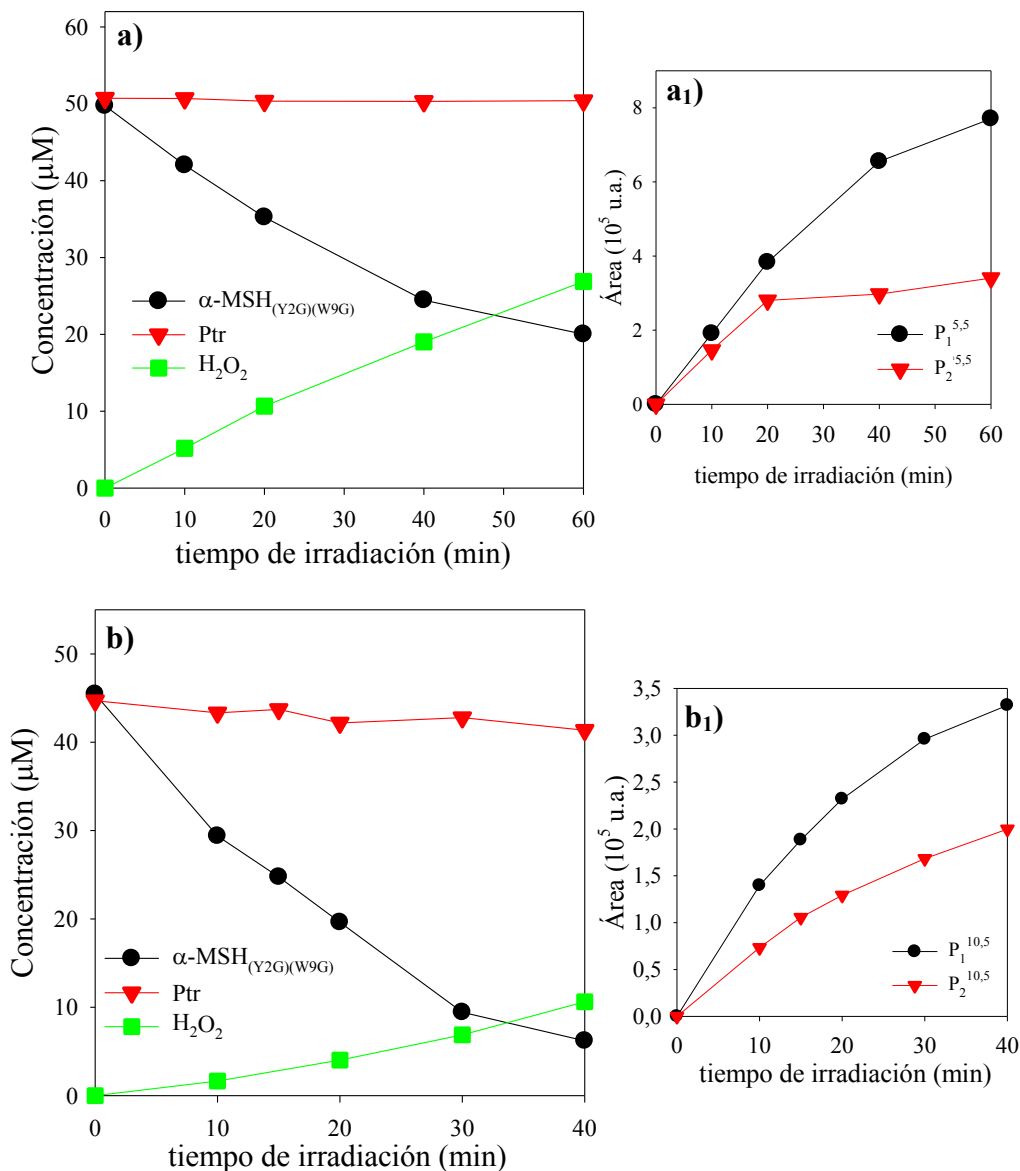


Figura 16.5. Evolución de la concentración de Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} y H₂O₂ de solución acuosa equilibrada con aire bajo irradiación UV-A en función del tiempo de irradiación, (a) pH 5,39; (b) pH 10,41; (a1) y (b1) Formación de los productos generados en la reacción. [Ptr]₀ = 100 μM; [α -MSH_{(Y2G)(W9G)}]₀ = 50 μM; $\lambda_{\text{ana}}(\text{MSH}_{(Y2G)(W9G)})$ = 220 nm; $\lambda_{\text{ana}}(\text{Ptr})$ = 340 nm λ_{irr} = 350 nm; l = 1 cm.

Las muestras irradiadas fueron analizadas con la técnica que se describió en el Capítulo 7, (*Sección 7.1.5*) para la detección de H_2O_2 . En la Figura 16.5 se presentan los resultados obtenidos para la generación de H_2O_2 como función del tiempo de irradiación en ambas condiciones de pH. Específicamente, en medio ácido la velocidad de generación de H_2O_2 ($\partial[H_2O_2]/\partial t = (0,453 \pm 0,017 \mu M/ min)$), fue similar a la velocidad de consumo del péptido ($-\partial[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]/\partial t = 0,531 \pm 0,031 \mu M/ min$). Por otra parte, a pH alcalino, la velocidad de producción de H_2O_2 ($\partial[H_2O_2]/\partial t = 0,245 \pm 0,139 \mu M/ min$) fue 5 veces menor en comparación con la velocidad de consumo de $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ ($-\partial[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]/\partial t = 1,178 \pm 0,090 \mu M/ min$) en estas condiciones.

16.1.3 Controles

Se llevaron a cabo experimentos de control, similares a los descritos para los anteriores capítulos. Se tomaron los espectros de absorción de los reactivos y se cuantificó por *HPLC* las concentraciones de las soluciones conservadas en oscuridad, los resultados indicaron que no hay cambios espectrales y además no existía ningún cambio en la concentración. Por otra parte, no se observaron cambios espectrales ni variaciones en la concentración de péptido cuando este es irradiado, indicando que no existen cambios químicos sobre la molécula en estas condiciones.

16.2 Análisis de fotoproductos

16.2.1 Espectrometría de masas (UPLC-MS)

La fórmula molecular de $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ es $C_{58}H_{89}N_{19}O_{19}$ y su peso molecular es 1355,84 Da. El análisis se realizó utilizando el equipo UPLC acoplado a un espectrómetro de masa (*Sección 7.1.3*). Los espectros de masas, se registraron en modo positivo y negativo (ESI^+ y ESI^-), pero las mejores señales se observaron en el modo ESI^+ .

El análisis de las soluciones antes de la irradiación mostraron la aparición de un pico con $t_r = 5,96$ min, el cual mostró un ion molecular a $m/z = 678,838$ Da que corresponde al ion dicargado de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} ($[M + 2H]^{2+} = [MSH_{(Y2G)(W9G)} + 2H]^{2+}$). Por parte se observó otro pico con $t_r = 6,82$ min donde se detectó el ion molecular intacto de la Ptr ($[M + H]^+ = [Ptr + H]^+$) a $m/z = 164,0574$ Da y además el ion molecular más K⁺ ($[M + K]^+ = [Ptr + K]^+$) a $m/z = 202,0129$ Da (Figura 16.6).

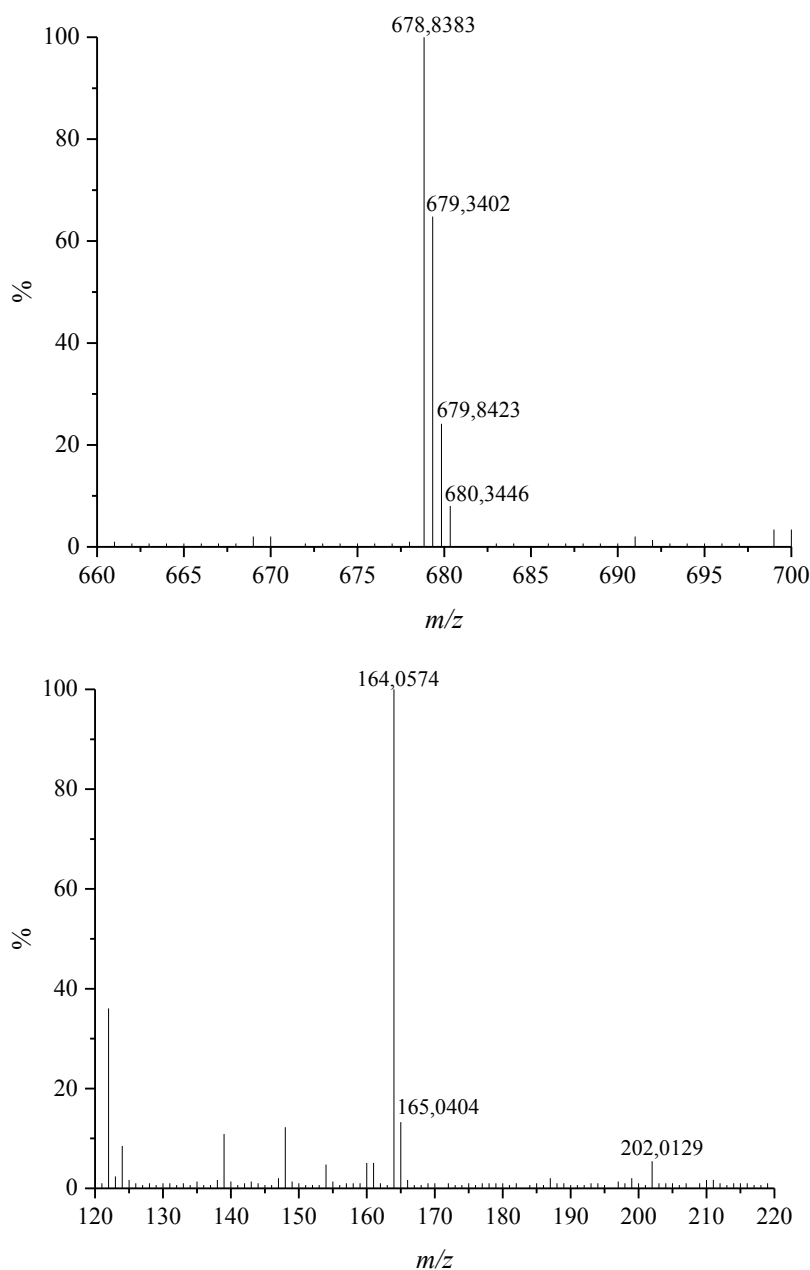


Figura 16.6. Espectro MS de los picos con t_r 6,82 min y 5,96 min correspondiente (a) Ptr y (b) α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, registrados en soluciones equilibradas en aire sin irradiar. $[Ptr]_0 = 100 \mu M$; $[\alpha$ -MSH_{(Y2G)(W9G)]₀ = 50 μM ; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.}

El estudio de las muestras irradiadas en ambas condiciones de pH, mostró una disminución significativa del área que corresponde al péptido y además, la aparición de varios picos que eluyen con t_r menor que el péptido, los cuales puede ser una mezcla de diferentes productos.

16.2.1.1 Medio ácido

Haciendo el análisis para las soluciones irradiadas a pH 5,5, se determinó la formación de diferentes productos con t_r muy similar y menor que el correspondiente al péptido. El espectro de masa obtenido mostró la formación de los iones moleculares m/z 686, 8319 Da, m/z 694,8344 Da y m/z 702,8290 Da, que corresponden a la incorporación de uno ($[\text{MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})} + \text{O} + 2\text{H}]^{2+}$), dos ($[\text{MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})} + 2\text{O} + 2\text{H}]^{2+}$) y tres ($[\text{MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})} + 3\text{O} + 2\text{H}]^{2+}$) átomos de oxígeno al péptido, respectivamente (Figura 16.7). Como se puede observar en los espectros de masas, estas m/z muestran un conjunto de picos, los cuales tienen una separación de 0,5 Da, indicando que la mejor detección para estos fue en modo dicargado. Los cromatogramas obtenidos a cada m/z fijo, presentaron la formación de un único pico para cada m/z , con $t_r = 5,83$ min, 5,80 min y 5,78 min (Figura 16.7 (a), (b) y (c)). El seguimiento de estos picos en función del tiempo de irradiación dio como resultado un aumento en su área debido a la reacción fotosensibilizada. Además, se generan otros picos con m/z 681,32 Da y 673,82 Da que por el momento no fueron identificados (Figura 16.7).

Es importante aclarar que en el cromatograma de absorbancia se observó la aparición de un solo pico en las soluciones irradiadas, pero se identificó la formación de varios productos para este pico con t_r muy cercanos.

Por otra parte, en el caso de la His libre se reportó la formación de dímeros, en este caso se detectó la aparición de un pico correspondiente a la dimerización de $\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}$, pero su intensidad fue relativamente baja en las condiciones de trabajo.

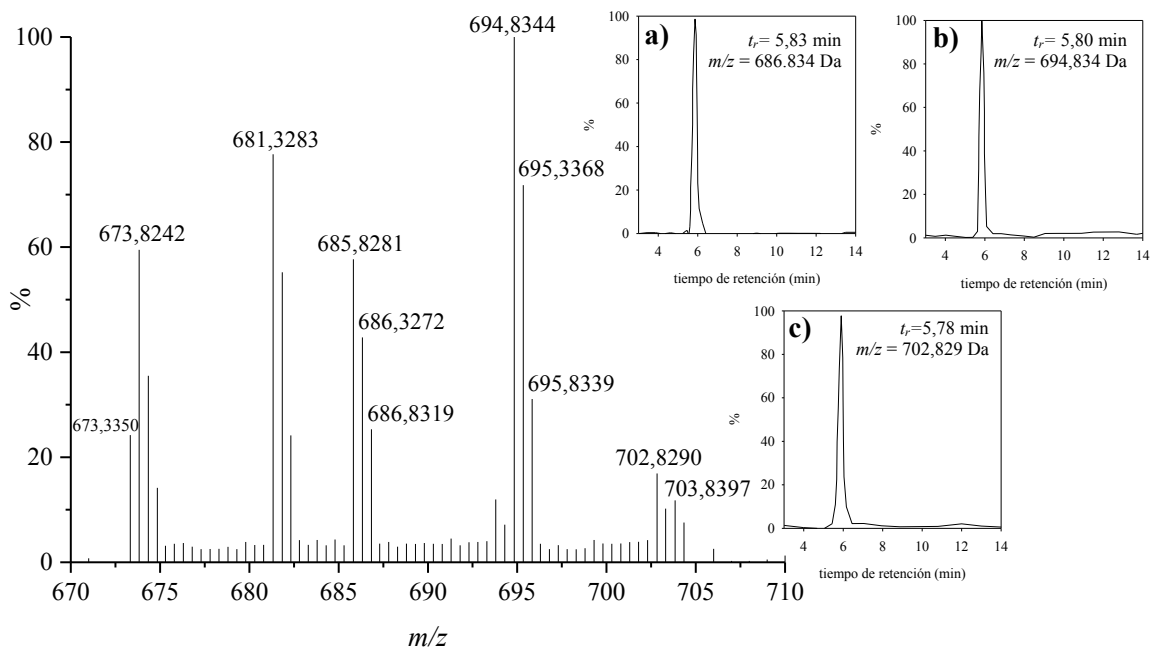


Figura 16.7. Espectro MS extraído de soluciones irradiadas por 60 min de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en presencia de Ptr equilibradas con aire. **(a)** Cromatograma de masas a $m/z = 686,83$ Da. **(b)** Cromatograma de masas a $m/z = 694,83$ Da. **(c)** Cromatograma de masas a $m/z = 702,82$ Da. $[Ptr]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 = 50 \mu\text{M}$; pH = 5,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V.

16.2.1.2 Medio alcalino

Las soluciones equilibradas con aire a pH 10,5 fueron irradiadas por 60 min, mostraron la formación de diferentes picos a m/z de 686,839 Da y 694,834 Da, los cuales corresponden a las incorporaciones de uno ($[\text{MSH}_{(Y2G)(W9G)} + \text{O} + 2\text{H}]^{2+}$) y dos ($[(\text{MSH}_{(Y2G)(W9G)} + 2\text{O} + 2\text{H})]^{2+}$) átomos de oxígeno (Figura 16.8). Además, se observó la aparición de a m/z 268,89 Da, que no fue identificado. Los formación de los productos oxigenados en función del tiempo de irradiación se presenta en la Figura 16.8 (a) en donde se puede observar que la incorporación de uno y dos átomos de oxígeno a la molécula de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} aumenta en función del tiempo de irradiación. Por otra parte, aunque la incorporación de tres átomos de oxígeno fue detectada, pero la intensidad de la señal es baja en estas condiciones.

Con los resultados obtenidos, se puede asegurar que la reacción fotosensibilizada de MSH_{(Y2G)(W9G)} por Ptr, conlleva al consumo del péptido y a la generación de productos oxigenados que en este caso degradan específicamente el residuo de His.

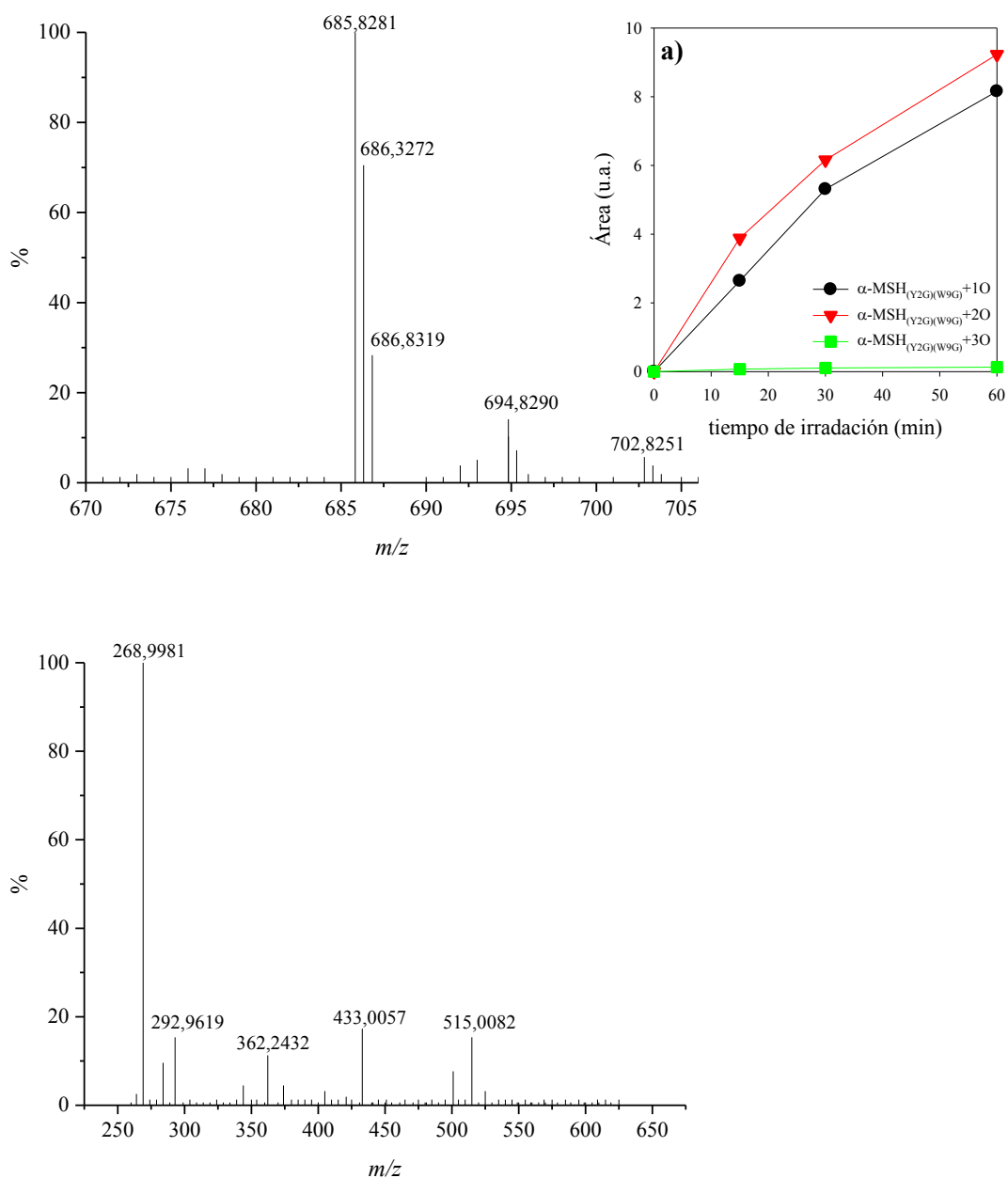


Figura 16.8. Espectros de masas de soluciones irradiadas por 60min.de $\alpha\text{-MSH}_{\text{Y2G}}$ en presencia de Ptr equilibradas con aire extraído de los picos de los cromatogramas a los correspondientes t_r . **(a)** Evolución de los productos oxigenados generados. $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{\text{Y2G}}]_0 = 350 \mu\text{M}$; pH= 10,5; Modo ESI⁺; Voltaje = 50 V; pH 10,5.

16.3 Determinación del mecanismo de reacción

16.3.1 Rol del Oxígeno

En la Figura 16.9 se presenta el consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} relativo a la concentración inicial, en ambas condiciones de pH, para diferentes concentraciones de O_2 . Los perfiles de concentración del péptido a pH 5,5 muestran una clara inhibición en la velocidad de consumo de las soluciones saturadas con O_2 en comparación con las soluciones equilibradas con aire. Este efecto también se observa en la formación de los productos, en donde se inhibe la producción de los mismos en las soluciones en saturación de O_2 .

También se puede deducir que, si el 1O_2 tuviera un rol principal en el mecanismo de reacción, la velocidad de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en soluciones saturadas con O_2 debería ser del mismo orden ó mayor que las soluciones aireadas (Figura 16.9 (a)).

Por otra parte, a pH alcalino la comparación de velocidades en soluciones saturadas con O_2 y en aire, mostró un comportamiento similar, lo que quiere decir que en estas condiciones de pH posiblemente el 1O_2 podría ser una de las especies oxidantes, siempre y cuando el rendimiento cuántico de producción de 1O_2 no esté afectado por la variación de la concentración de O_2 . Además la formación de los productos que se generan debido a la reacción fotosensibilizada entre la Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, aumentan en condiciones de saturación de O_2 (Figura 16.9 (b)).

En condiciones anaeróbicas, se observó total inhibición de consumo del péptido para ambas condiciones de pH, además no se generaron productos en estas condiciones. Lo que indica que para que la reacción ocurra, es necesaria la presencia de O_2 en el medio (Figura 16.9).

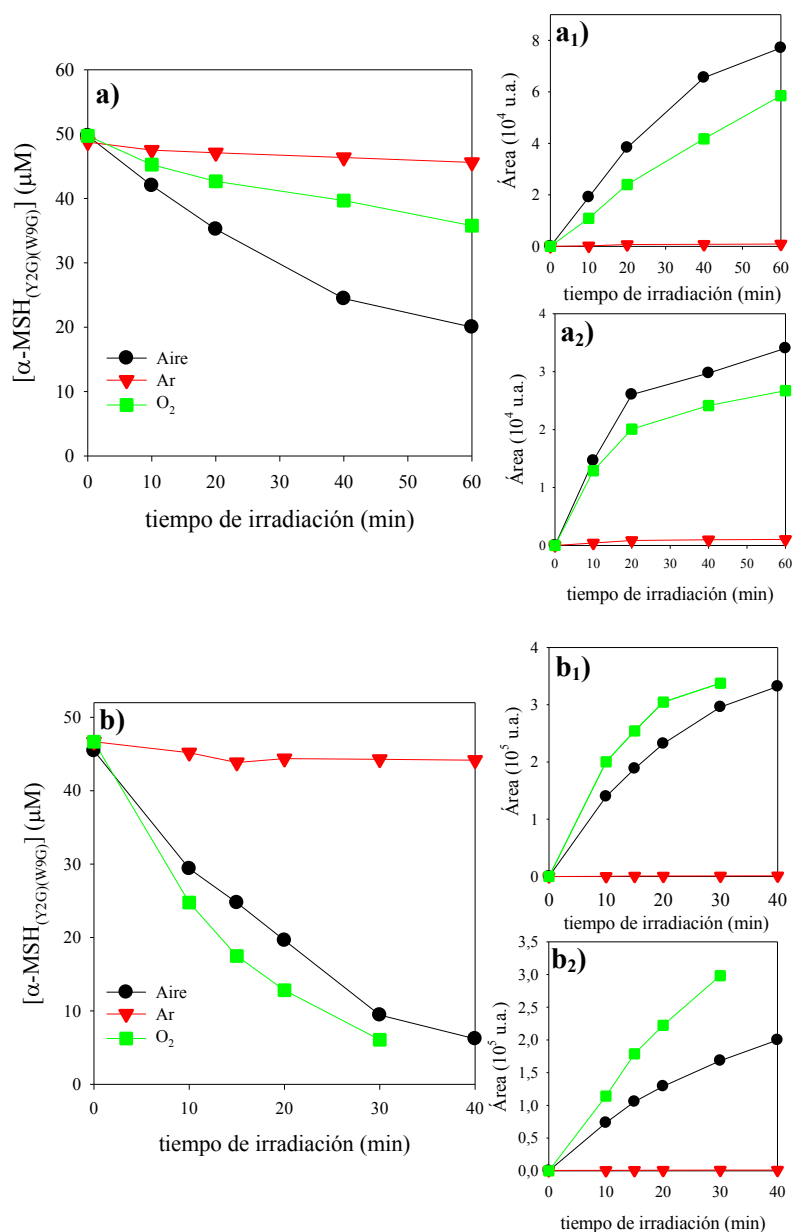


Figura 16.9. Evolución de la concentración de $\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}$ de soluciones acuosas equilibradas con aire, y saturación en Ar y O₂ en función del tiempo de irradiación. **(a)** pH 5,46. **(a₁) - (a₂)** Formación del producto $\text{P}_1^{5,5}$ y $\text{P}_2^{5,5}$ respectivamente. **(b)** pH 10,54. **(b₁) - (b₂)** Formación del producto $\text{P}_1^{10,5}$ y $\text{P}_2^{10,5}$ respectivamente. $[\text{Ptr}]_0 = 50 \mu\text{M}$ y $[\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

16.3.2 Irradiación en presencia de Yoduro de Potasio (KI)

Se realizaron pruebas en presencia y en ausencia de KI (400 μM) y los resultados se presentan en la Figura 16.10, donde se observa una inhibición en la velocidad de consumo del péptido en presencia de KI, lo que indica que el estado excitado triplete del

sensibilizador está participando en la reacción de fotosensibilización. Además, la presencia de I^- también provocó, como era de esperarse una inhibición en la formación de los productos.

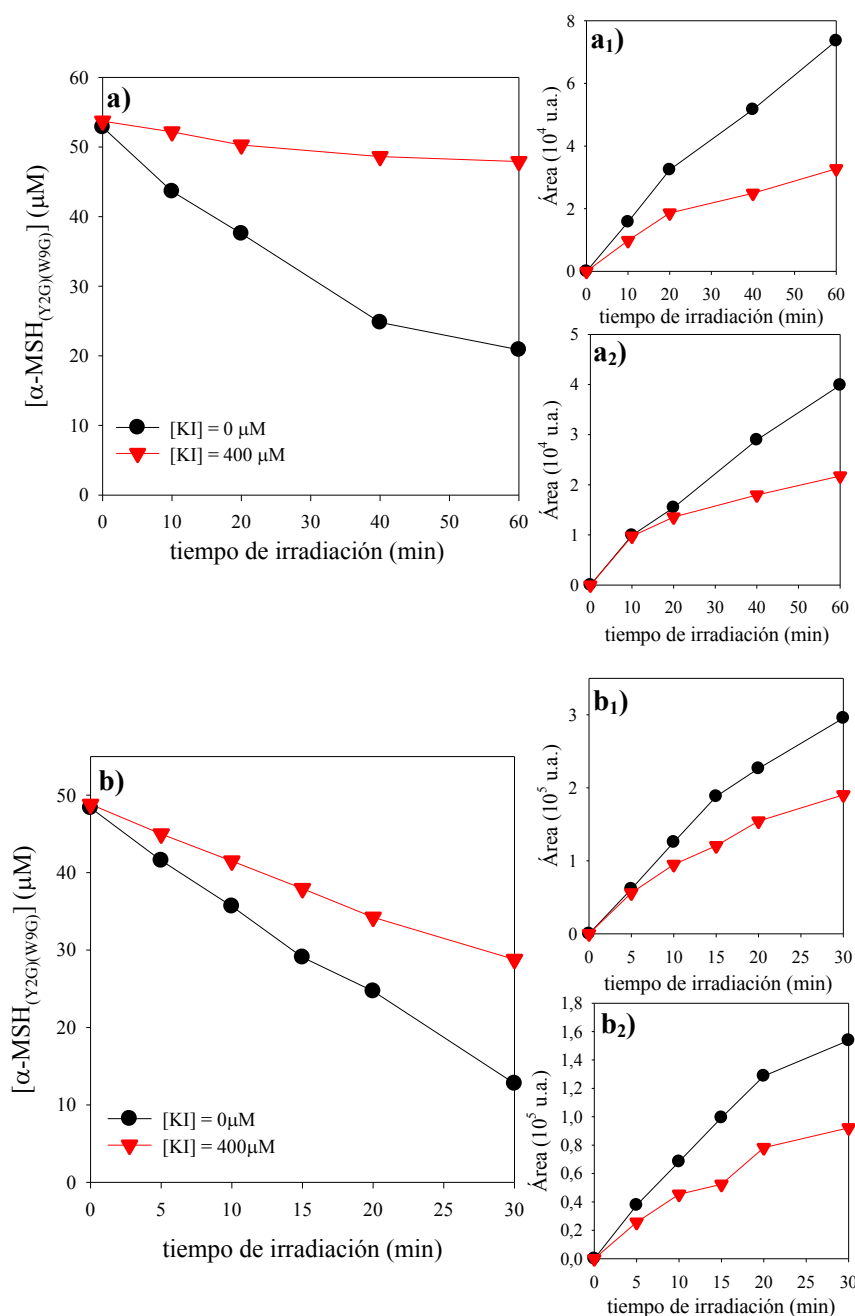


Figura 16.10. Evolución de la concentración de $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ de soluciones acuosas equilibradas con aire, en presencia y ausencia de KI en función del tiempo de irradiación, (a) pH 5,61. (a₁) - (a₂) Formación del producto $P_1^{5,5}$ y $P_2^{5,5}$ respectivamente. (b) pH 10,59. (b₁) - (b₂) Formación del producto $P_1^{10,5}$ y $P_2^{10,5}$ respectivamente. $[Ptr]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 = 50 \mu\text{M}$; $[KI] = 400 \mu\text{M}$; $\lambda_{irr} = 350\text{nm}$; $l = 1\text{cm}$.

16.3.3 Contribución de la oxidación por 1O_2

Se realizaron experimentos en H_2O y D_2O , los resultados se presentan en la Figura 16.11, donde se puede observar que en medio ácido la velocidad de consumo del péptido en H_2O y D_2O es similar, descartando así la participación del mecanismo tipo II como mecanismo predominante. Además la formación de productos también es similar en ambos solventes Figura 16.11 (a). Por otra parte, en medio alcalino el consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} es considerablemente mayor en D_2O en comparación con el consumo en H_2O (Figura 16.11 (b)), demostrando que el 1O_2 está fuertemente involucrado en la reacción en estas condiciones de pH. Aunque podemos confirmar que el 1O_2 está involucrado, la velocidad de consumo en D_2O fue 11 veces mayor que en H_2O , por lo tanto no se puede asegurar que sea un mecanismo tipo II puro. El efecto de la formación de los productos es similar, es decir, en el solvente deuterado donde se observa una aceleración en la formación de ambos productos en medio alcalino, indicando en este caso que la especie oxidante podría ser el 1O_2 .

Para confirmar esto, se evaluó la contribución del 1O_2 en la oxidación fotosensibilizada de α -MSH_{(Y2G)(W9G)}, considerando las constantes de reacción reportadas para la His libre en ambas condiciones de pH (k_r^{His} de $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para pH alcalino y $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para pH ácido²). Se calculó la velocidad inicial de reacción química entre el 1O_2 y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} (Ecuación (16.1)) en estas condiciones y se compara con la experimental.

$$\left(\frac{\partial [\alpha - \text{MSH}_{(Y2G)(W9G)}]}{\partial t} \right)_{0,calc} = k_r^{His} [\alpha - \text{MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0 [^1O_2]_{ss} \quad (16.1)$$

donde $[^1O_2]_{ss}$ es la concentración en estado estacionario de 1O_2 durante la irradiación de la solución que contiene Ptr y α -MSH_{(Y2G)(W9G)} y puede calcularse como se explicó en el Capítulo 6. En la Tabla 16.1, se presentan las velocidades de consumo del péptido en ambas condiciones de pH, en donde se puede ver que en medio ácido las velocidades calculadas y experimentales son de ordenes diferentes, lo que confirma que el mecanismo predominante para la degradación del péptido en estas condiciones de pH no está mediado por el 1O_2 . Por otra parte, en medio alcalino ambas velocidades (calculada

y experimental tienen órdenes similares, lo que significa que en este caso el mecanismo tipo II juega un rol significativo en la oxidación de α -MSH_{(Y2G)(W9G)}.

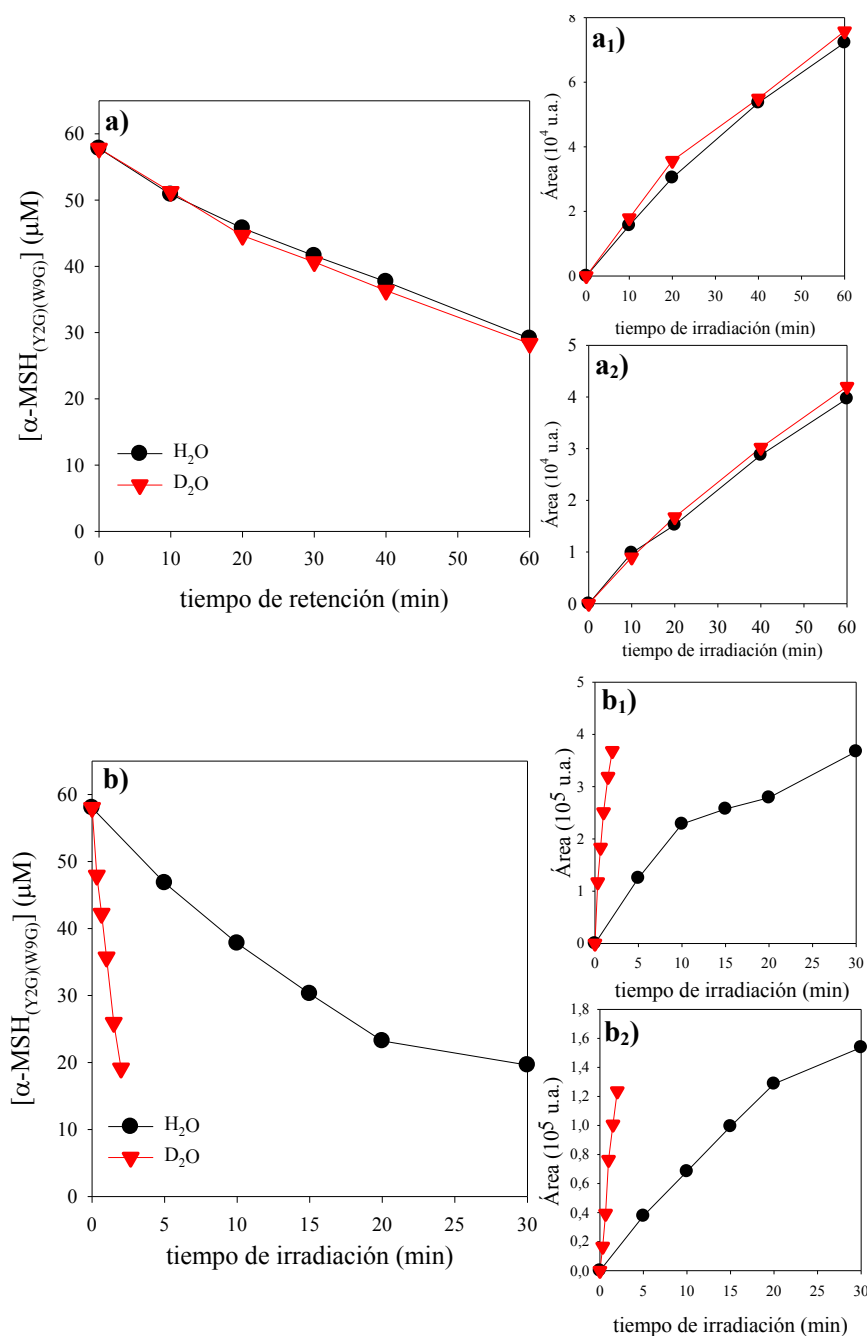


Figura 16.11 Evolución de la concentración de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} de soluciones acuosas equilibradas con aire en H₂O y D₂O en función del tiempo de irradiación. **(a)** pH 5,52 / pD 5,05. **(a₁) - (a₂)** Formación del producto P₁^{5,5} y P₂^{5,5}, respectivamente; **(b)** pH 10,50 / pD 10,15; **(b₁) - (b₂)** Formación del producto P₁^{10,5} y P₂^{10,5}, respectivamente; [Ptr]₀ ~ 50 μM ; $[\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}]_0$ ~ 50 μM ; λ_{irr} = 350 nm; l = 1 cm.

Tabla 16.1. Velocidades experimentales y calculadas de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} durante la irradiación en presencia de Ptr (50 μ M) de soluciones aireadas.

	Solvente	P₀ (Einstein L⁻¹ s⁻¹)	Experimental (μM min⁻¹)	Calculado* (μM min⁻¹) (para la reacción con ¹ O ₂)
pH/pD 5.5	H ₂ O	1,40 x 10 ⁻⁵	-0,53 ± 0,04	-0,066
	D ₂ O		-0,55 ± 0,03	-1,28
pH/pD 10.5	H ₂ O	1,40 x 10 ⁻⁵	-1,7 ± 0,2	-1,98
	D ₂ O		-19,2 ± 1,2	-25,8

*Este valor fue calculado para la reacción de His con ¹O₂

16.3.4 Irradiación en presencia de SOD

En esta sección se analizó la participación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en la reacción fotosensibilizada de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} por Ptr. La Figura 16.12 muestra la velocidad de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en soluciones irradiadas estabilizadas en aire que contenían el péptido y Ptr en ambas condiciones de pH en presencia y ausencia de SOD. Para las soluciones en medio ácido la velocidad de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} aumenta en presencia de SOD con respecto al control medido en ausencia de la enzima. Este resultado puede confirmar la participación de $O_2^{\bullet-}$ en el proceso, debido a que se observa un cambio en la velocidad de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} al agregar SOD. Con este resultado se podría plantear un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones desde el estado fundamental del péptido al estado triplete de fotosensibilizador, para formar el par radical (Ptr $^{\bullet-}$ y MSH_{(Y2G)(W9G)} $^{\bullet+}$). A su vez el radical de la Ptr (Ptr $^{\bullet-}$) reacciona con el O₂ del medio, para dar $O_2^{\bullet-}$. El aumento en la velocidad de consumo de α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en presencia de SOD, puede ser explicado teniendo en cuenta que se está inhibiendo una vía de recuperación del radical MSH_{(Y2G)(W9G)} $^{\bullet+}$.

Por otra parte, en las condiciones alcalinas no se observó aceleración en la velocidad de consumo del péptido en presencia de SOD, lo que podría explicarse como la baja participación del $O_2^{\bullet-}$ en estas condiciones.

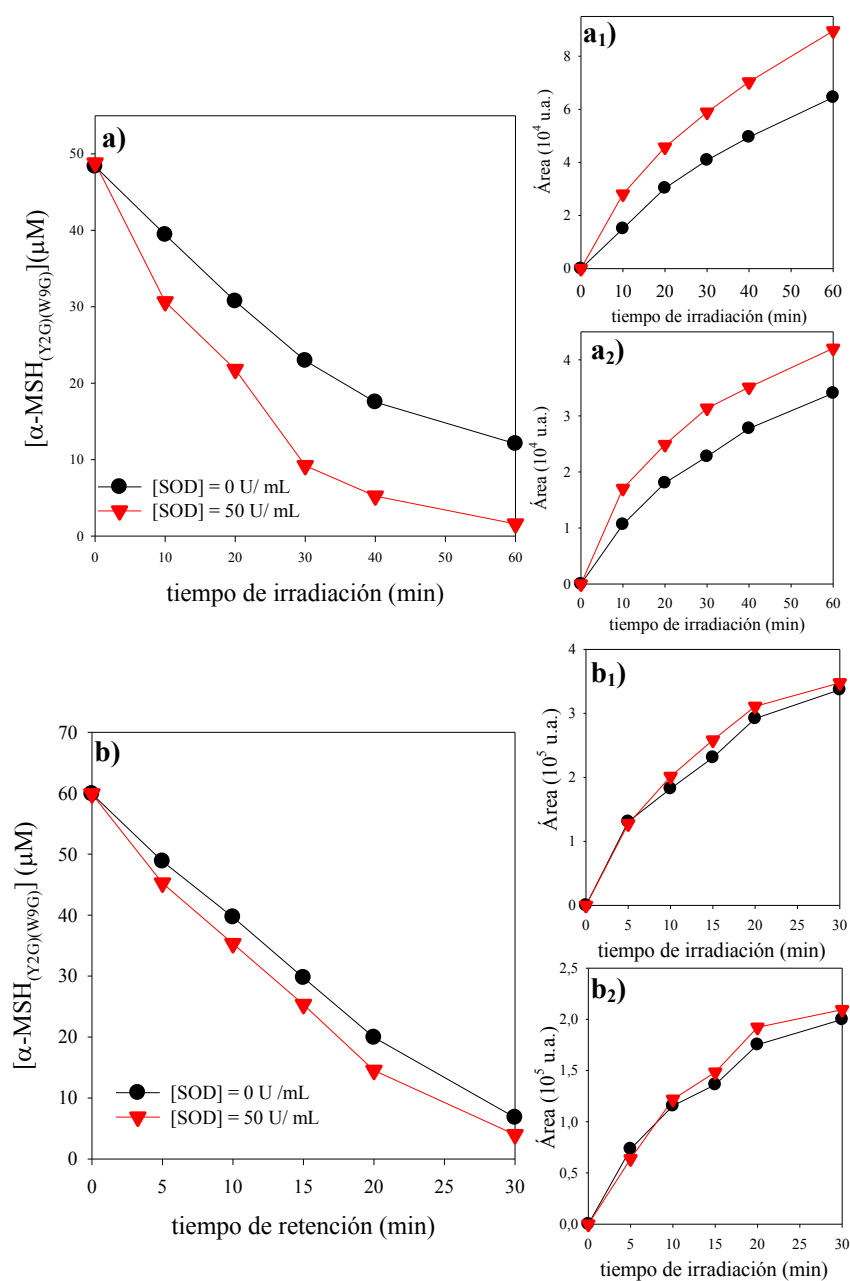
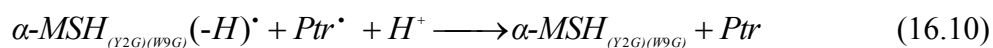
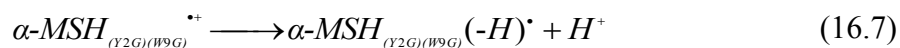
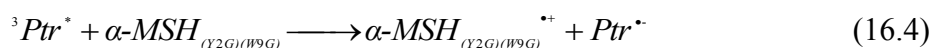


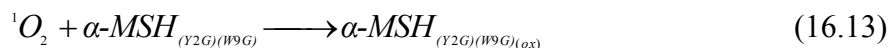
Figura 16.12. Evolución de la concentración de $\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}$ de soluciones acuosas equilibradas con aire, en presencia y ausencia de SOD en función del tiempo de irradiación, **(a)** pH 5,43. **(a)₁** - **(a)₂** Formación del producto $\text{P}_1^{5,5}$ y $\text{P}_2^{5,5}$, respectivamente. **(b)** pH 10,45. **(b)₁** - **(b)₂** Formación del producto $\text{P}_1^{10,5}$ y $\text{P}_2^{10,5}$, respectivamente. $[\text{Ptr}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}]_0 = 100 \mu\text{M}$; $[\text{SOD}] = 50 \text{ U/mL}$; $\lambda_{\text{irr}} = 350 \text{ nm}$; $l = 1 \text{ cm}$.

16.3.5 Mecanismo de reacción propuesto

El proceso inicia con la absorción de un fotón por parte del sensibilizador y la formación del estado excitado singlete que luego por ISC genera los estados excitados tripletes (Reacción 16.1). Esta especie excitada puede reaccionar con O_2 para generar 1O_2 por transferencia de energía (Reacción 16.3). Por transferencia electrónica desde $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ hacia $^3P_{tr}^*$ se generan los correspondientes pares radicales (Reacción 16.4). En medio ácido, $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}^{**}$ se desprotona rápidamente para generar el radical neutro (Reacción 16.7). Las vías que conducen al consumo del sustrato provienen de las reacciones entre $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}(-H)^{\bullet}$ y O_2 (Reacción 16.12). Finalmente, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}(-H)^{\bullet}$ para regenerar a $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ (Reacción 16.8) ó dar productos oxidados (Reacción 16.11).

En el medio alcalino, se puede generar la reacción entre $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ en estado fundamental y el 1O_2 (Reacción 16.13). Esta última reacción, aunque es predominante en medio alcalino, no resulta ser la vía de consumo mayoritaria en las condiciones ácidas.





16.4 Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la oxidación de la $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ fotosensibilizada por Ptr bajo irradiación UV-A, mostró, al igual que la His libre, un mecanismo dependiente del pH, es decir, para las soluciones en medio ácido, se demostró que predomina un mecanismo tipo I, en donde existe una transferencia de electrones desde el estado fundamental del péptido al estado triplete de la Ptr, desde donde se generan diferentes reacción que llevan al consumo del péptido. Por otra parte, en medio alcalino se demostró que existe una alta participación del mecanismo tipo II, en donde se genera una transferencia de energía del fotosensibilizador al O_2 en estado fundamental, lo que conlleva a la generación de 1O_2 , el cual es una especie altamente oxidante que puede llevar a la oxidación de la $\alpha\text{-MSH}_{(Y2G)(W9G)}$ en estas condiciones. Para ambas condiciones de pH se observó la generación de diferentes productos, específicamente incorporaciones de O_2 a la molécula del péptido.

Bibliografía

1. Thomas, A. H.; Lorente, C.; Capparelli, A.; Martínez, C.; Braun, A.; Oliveros, E. ; *Photochem. Photobiol Sci*; **2**, 245–250 (2003).
2. Matheson, I. B. C. and J. L. No Title. *Photochem. Photobiol.* **29**, 879–881 (1978).
3. Wilkinson, F.; Helman, H. P.; and Ross, A. B. ; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **24**, 663–1021 (1995).
4. Ogilby, P. R. and Foote, C. S. ; *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3423–3430 (1983).

PARTE V

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

Las pterinas son compuestos heterocíclicos que se encuentran comúnmente en sistemas biológicos, principalmente como pigmentos en insectos y como cofactores enzimáticos de muchas reacciones. Los derivados pterínicos, también se pueden acumular en la piel de pacientes que sufren vitiligo, una enfermedad cutánea, en donde se presenta déficit en la pigmentación ya que se interrumpe parcial ó totalmente la síntesis de la melanina. La falta de pigmentación hace que el tejido afectado no tenga una protección adecuada contra la radiación UV y, por lo tanto, los procesos fotoquímicos en los que participan compuestos presentes en la piel adquieren particular importancia.

El daño producido por la radiación UV-A a los diferentes componentes celulares, puede ser generado indirectamente por reacciones de fotosensibilización, en donde una segunda molécula denominada fotosensibilizador, absorbe radiación y desde un estado electrónicamente excitado puede iniciar diferentes tipos de reacciones que conducen a la oxidación de la molécula. Estas reacciones pueden ocurrir a por una transferencia de electrones entre fotosensibilizador y sustrato (mecanismo tipo I) o por una transferencia de energía al O_2 en estado fundamental, que conduce a la formación de 1O_2 (mecanismo tipo II).

Se ha demostrado que las pterinas pueden actuar como fotosensibilizadores de compuestos biológicos cuando son excitados con radiación UV-A. Además son capaces de fotoinducir daño al ADN, a través de mecanismos tipo I y tipo II. Existen diferentes reportes en donde se ha demostrado que la pterina (Ptr) puede fotoinducir modificaciones químicas en nucleótidos a través de una transferencia de electrones desde el estado triplete del fotosensibilizador al estado fundamental del nucleótido. También se ha reportado que el Trp en su forma libre puede oxidarse en reacciones de fotosensibilización inducidos por Ptr a través de un mecanismo tipo I.

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudiaron reacciones fotosensibilizadas por Ptr que afectan los aminoácidos libres y en entorno peptídico. Los fotosensibilizadores utilizados fueron pterina (Ptr) y metilpterina (Mep). Se eligieron para este estudio 3 aminoácidos libres, los cuales fueron, tirosina (Tyr), histidina (His) y metionina (Met). Por otra parte, para el estudio de los péptidos se eligió como molécula modelo, como lo la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), la cual estimula la producción de melanina por melanocitos en la piel y cabello y además en su secuencia contiene los

residuos de aminoácidos más susceptibles a la oxidación (triptófano (Trp), Tyr, His, Met). Se estudió el efecto de estos aminoácidos en una cadena peptídica y se realizó una comparación con los resultados obtenidos con los aminoácidos libres. Por otra parte, para realizar estudios más profundos de la oxidación de la α -MSH, en los cuales se mutaron algunos aminoácidos sobre la secuencia del péptido, para estudiar la reactividad de estos.

Las conclusiones generales obtenidas en este trabajo se dividen en tres grandes grupos, los cuales se presentan a continuación:

1. Interacción de los estados excitados de la Ptr con aminoácidos

Mediante estudios de fluorescencia y LFP se investigó la interacción de los aminoácidos con los estados excitados singletes y tripletes de la Ptr, respectivamente.

Los resultados demostraron que, Trp y Met desactivan el estado singlete de la Ptr en mayor orden, mientras que la His no es un buen desactivador, inclusive a altas concentraciones. En el caso de la Tyr, no se obtuvieron resultados similares debido que las concentraciones que se puede alcanzar con Tyr no fueron suficientemente altas como para obtener una desactivación apreciable.

Para el estudio de los estados tripletes, los resultados obtenidos demostraron que existe un efecto sobre el τ_{T1} de la Ptr mientras que para el τ_{Tc} no se observa. Estos resultados también indicaron que existe una desactivación del estado excitado triplete de Ptr por aminoácidos, mostrando mayor efecto la Tyr (10^9). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Valores de constantes de Stern-Volmer, de desactivación del estado singlete y triplete de la Ptr por aminoácidos.

	Singlete	Triplete	
	$k_q (10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_q (10^9) (\tau_{T1})$	$k_q (10^9) (\tau_{Tc})$
Triptófano (Trp)	5,95	$1,5 \pm 0,1$	$3,1 \pm 1$
Tirosina (Tyr)	-	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 1$
Histidina (His)	-	$1,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 1$
Metionina (Met)	3,31	$0,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 1$

2. Degradación de aminoácidos libres

Se evaluó la capacidad de la Ptr para fotosensibilizar la degradación de Tyr, His y Met, en soluciones acuosas, las cuales fueron expuestas a radiación UV-A (320 – 400 nm). En esta región del espectro solo absorbe radiación la Ptr mientras que los aminoácidos no absorben. Los experimentos se realizaron pH de 5,5-6,0. Adicionalmente, para la His también se realizaron pruebas en otras condiciones de pH, debido a su reactividad en condiciones alcalinas (pH = 10,0 - 10,5).

Tirosina

- ✓ Los resultados obtenidos demostraron que cuando soluciones aireadas de Tyr son irradiadas en presencia de Ptr, el aminoácido se consume, mientras la concentración de fotosensibilizador permanece constante. Durante el proceso se identificó que el oxígeno disuelto se consume y además hay generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- ✓ En condiciones anaeróbicas no existe consumo del aminoácido, demostrando así que el oxígeno es indispensable para que ocurra la reacción. Además, en condiciones de saturación de oxígeno se observa inhibición en el consumo del aminoácido, por lo tanto, se puede deducir que el estado triplete está involucrado.
- ✓ Se identificó la generación de diferentes productos, inducidos por la reacción fotosensibilizada, tales como L-DOPA, L-Dopacroma. Además se observó la formación de productos diméricos (Tyr_2), los cuales están involucrados en el *crosslinking* de las proteínas (Tabla 2).
- ✓ El análisis del mecanismo indicó que la reacción por la cual la Ptr fotosensibiliza la oxidación de Tyr, no envuelve principalmente un mecanismo tipo II (1O_2), pero si un mecanismo iniciado por una transferencia de electrones inducido por Ptr, lo que lleva a la formación del par radical ($Ptr^{\bullet-}$ y $Tyr^{\bullet+}$) (Esquema de reacción).

Histidina

- ✓ La reacción fotosensibilizada demostró que existe una oxidación del aminoácido, mientras que la Ptr permanece constante. Se observó consumo de oxígeno en ambas condiciones de pH, pero la generación de H_2O_2 fue mayor a pH ácido.
- ✓ Las velocidades de consumo en condiciones de saturación de oxígeno demostró que en medio ácido se observa una inhibición en comparación con las soluciones aireadas, evidenciando que el mecanismo tipo II podría no predominar en este medio. Por el contrario, en medio alcalino la degradación de la His en soluciones saturadas con oxígeno fueron similares al consumo de soluciones equilibradas con aire, indicando así que la degradación de His a pH alcalino predomina un mecanismo tipo II, pero no es totalmente puro.
- ✓ La identificación de los productos de reacción dió como resultado a pH ácido un patrón de masas, que por el momento no se ha identificado ya que no coincide con lo reportado previamente para la oxidación de la His. Por otra parte en medio alcalino, se observó la oxidación de la His por uno o más endoperóxidos que conlleva al cierre del anillo y además la generación de dímeros oxidados de His. (Tabla 2)
- ✓ La oxidación de la His es dependiente del pH, en medio ácido (pH 5,5) se observó que predomina un mecanismo de transferencia de electrones (mecanismo tipo I). En el caso del medio alcalino (pH~ 10,5), ambos mecanismos (tipo I y II) están compitiendo para la degradación de la His (Tabla 2).

Metionina

- ✓ Se demostró que la reacción fotosensibilizada de Mep y Met bajo irradiación UV-A, conlleva al consumo del aminoácido, mientras que el fotosensibilizador permanece constante.
- ✓ Este proceso se llevó acabo tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, dando como resultado que en ambas condiciones existe reacción y en el caso de las condiciones anaeróbicas se observa un descenso del consumo de Mep. Con respecto a este último proceso, se puede decir que existen dos reacciones competitivas. Por un lado la recuperación del aminoácido por recombinación de los radicales, y por otra la reacción entre ellos que conlleva a la reducción de la Mep y a la formación de dihidrometilpterina (H_2Mep).

- ✓ En el proceso que es dependiente del O_2 se identificó la formación de al menos dos productos de oxidación de la Met, los cuales son sulfóxido de metionina (MetSO) y metionina sulfóna (MetSO₂), identificados como productos reportados en la literatura para las reacciones fotosensibilizadas de Met inducidas por otros fotosensibilizadores mediante mecanismos tipo I (Tabla 2).

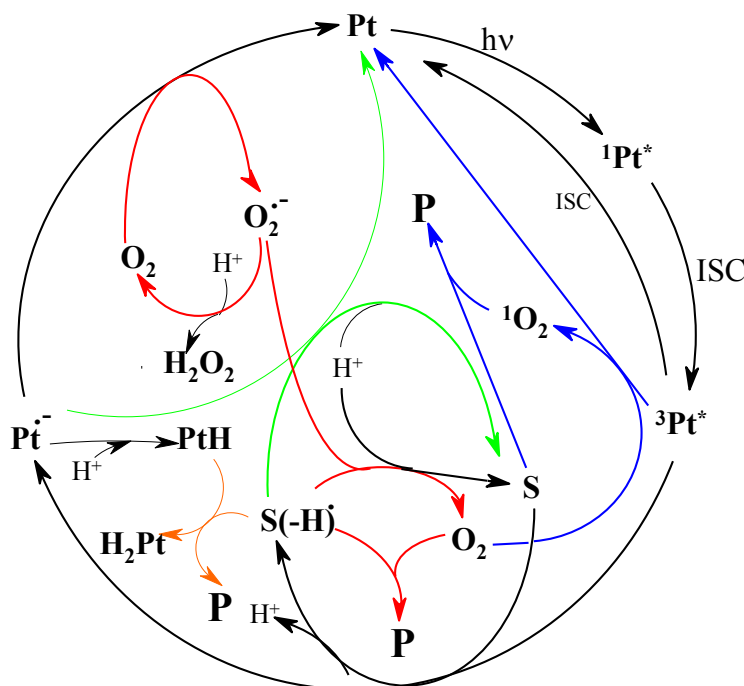
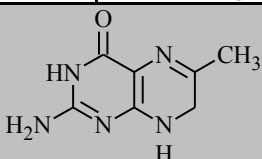


Tabla 2. Productos de oxidación de Tyr, His y Met inducidos por Ptr

S	P		
<p>Tyr $C_9H_{11}NO_3$</p>	<p>L-DOPA $C_9H_{11}NO_4$</p>	<p>L-Dopacroma $C_9H_{11}NO_4$</p>	<p>Dímeros de Tyr (Tyr₂) $C_{18}H_{20}N_2O_6$</p>
<p>His $C_6H_9N_3O_2$</p>	<p>pH ácido Productos no identificados.</p>		
	<p>pH alcalino</p> <div> <p>Dímeros de His oxidados $C_{12}H_{16}NO_8$ $C_{12}H_{16}NO_9$</p> </div>		
	<p>Condiciones aeróbicas</p>		

Met $C_5H_{11}NO_2S$		MetSO $C_5H_{11}NO_3S$	MetSO ₂ $C_5H_{11}NO_4S$
	Condiciones anaeróbicas	 <p>6-metil-7,8-dihidropterina H2Mep</p>	

3. Degradación de aminoácidos en entorno peptídico

Hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH)

- ✓ Las soluciones aireadas que contenían Ptr y α -MSH expuestas a radiación UV-A, mostraron consumo del péptido, y al mismo tiempo generación de H_2O_2 , mientras que el fotosensibilizador permanece constante.
- ✓ Los procesos fotosensibilizados llevan a la oxidación del péptido y a la degradación de al menos los residuos de triptófano (-Trp-) y tirosina (-Tyr-). Teniendo en cuenta que la Ptr fotosensibiliza estos dos aminoácidos en su forma libre, esto podría indicar que las incorporaciones de átomos de oxígenos tiene lugar sobre estos residuos de la hormona. Además, se observó la dimerización del péptido por el radical de la Tyr, lo cual indica que la Ptr puede fotoinducir *crosslinking* de péptidos.
- ✓ El mecanismo de reacción es iniciado por una transferencia de electrones desde α -MSH al estado excitado de la Ptr para formar el radical catión (α -MSH^{•+}) y el radical anión de la Ptr (Ptr^{•-}). Desde este punto se generan diferentes tipos de reacciones que conllevan al consumo del péptido y además a la formación de diferentes productos de reacción.
- ✓ Teniendo en cuenta que la α -MSH estimula la producción de melanina por los melanocitos en la piel y en el cabello y que la acumulación de derivados pterínicos se da en algunas enfermedades de la piel tales como el vitiligo, el daño de esta hormona fotoinducido por Ptr es un resultado importante desde el punto de vista biomédico.

Mutaciones de α -MSH: α -MSH_{Y2G}, α -MSH_{W9G}, α -MSH_{(Y2G)(W9G)}

Los péptidos estudiados fueron mutaciones de la α -MSH: i) α -MSH_{Y2G} se mutó la Tyr en la posición 2 por Gly, con el fin de realizar el estudio de fotooxidación específicamente sobre el residuo de Trp (-Trp-); ii) En α -MSH_{W9G} se mutó el Trp en la posición 9 por Gly, con el fin de evaluar la fotooxidación sobre el residuo de Tyr (-Tyr-); iii) en α -MSH_{(Y2G)(W9G)} se mutó la Tyr en la posición 2 y el Trp en la posición 9 por Gly, con el fin de evaluar el proceso de fotooxidación sobre el residuo de His (-His-).

- ✓ Los mecanismos confirman que en los tres péptidos a pH ácido el rol del oxígeno singlete (1O_2) producido por transferencia de energía desde el estado excitado de la Ptr al oxígeno disuelto (mecanismo tipo II) es despreciable. Mientras que para α -MSH_{(Y2G)(W9G)} en condiciones de pH alcalino este mecanismo es el que predomina. El mecanismo propuesto a pH ácido, es iniciado por la transferencia de electrones desde el péptido al estado excitado de la Ptr ($^3Ptr^*$) (Mecanismo tipo I), posteriormente el radical catión puede estar localizado en el residuo de Trp en α -MSH_{Y2G} (-Trp $^{\bullet+}$ -), en el residuo de Tyr para α -MSH_{W9G} (-Tyr $^{\bullet+}$ -) y en el residuo de His para α -MSH_{(Y2G)(W9G)} (-His $^{\bullet+}$ -), el cual es sometido a diferentes reacciones que conlleva a la oxidación del péptido.
- ✓ En el caso de α -MSH_{Y2G} se observó la formación de dos productos que envuelven al residuo de Trp, los cuales fueron identificados como 5-Hidroxitriptófano (5-HTP)), N-formilquinurenina (NFK), los cuales corresponden a la incorporación de uno y dos átomos de oxígeno respectivamente. También se identificó la formación de kinurenina (Kyn), generada por una reacción térmica de la NFK. Por espectrometría de masas se identificaron la incorporación de hasta 4 oxígenos a la molécula de α -MSH_{Y2G}.

Tabla 3. Productos de oxidación de α -MSH_{Y2G} inducidos por Ptr

R_1 -Trp ⁹ - R_2			
α -MSH _{Y2G} $C_{70}H_{104}N_{21}O_{18}S$	N-formilquinurenina (NFK) $C_{70}H_{104}N_{21}O_{20}S$	L-quinurenina (Kyn) $C_{69}H_{104}N_{21}O_{19}S$	5- Hidroxitriptófano 5-HTP $C_{70}H_{104}N_{21}O_{19}S$

- ✓ En el caso de α -MSH_{W9G} se observaron productos con pesos moleculares correspondientes a dos moléculas de péptido, generados debido a la reacción

fotosensibilizada. Se identificó la espectroscopia típica de los dímeros de tirosina (Tyr_2) y se confirmó la dimerización para este compuesto, mientras que para los otros dos péptidos no fue observada. Se observaron productos oxigenados sobre el monómero y el dímero, revelando que la dimerización y la oxidación son procesos independientes y simultáneos.

- ✓ La identificación de los productos del péptido $\alpha\text{-MSH}_{(\text{Y2G})(\text{W9G})}$ indicó que en ambas condiciones de pH se generaron productos oxigenados de la His, incorporándose al menos dos átomos de oxígeno a la molécula del péptido, los cuales aumentan en función del tiempo de irradiación.